

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE  
ALGINATOS EN *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*  
(*Laminariales*) y *Sargassum sp* (*Fucales*).”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO**

**Br. AMAYA CHUYES ANA BELÉN**

**LINEA DE INVESTIGACIÓN:  
BIODIVERSIDAD Y MEJORAMIENTO GENETICO  
SUB LINEA DE INVESTIGACION:  
BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Piura – Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE ALGINATOS EN  
*Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp*  
(Fucales).”**

**LINEA DE INVESTIGACIÓN:**  
BIODIVERSIDAD Y MEJORAMIENTO GENETICO  
**SUB LINEA DE INVESTIGACION:**  
BIODIVERSIDAD Y BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

Br. Ana Belén Amaya Chuyes.

Ejecutor

Mchgo. María Dorothy Torres de León, M.Sc.

Asesora

Dr. Marcel Gutiérrez Correa +

Co-asesor

## DECLARACION JURADA

Yo: Ana Belén Amaya Chuyes, identificado con CU/DNI N° 47469194, Bachiller de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y domiciliado en el Jr. Sullana N°201-B del Distrito de Veintiséis de Octubre, Provincia de Piura, departamento de Piura, Celular 943757526, Email: [amayachuyes.anabelen@gmail.com](mailto:amayachuyes.anabelen@gmail.com)

**DECLARO BAJO JURAMENTO:** que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, Diciembre del 2019



Ana Belén Amaya Chuyes  
DNI N° 47469194

Artículo 411.- El que, en un procedimiento administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4, Inciso 4,12 del reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE ALGINATOS EN  
*Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp*  
(Fucales).”**

**JURADO EVALUADOR**



Dr. Roberto Mendoza Rendón.

Presidente



Mchgo. César Augusto Torres Díaz, M.Sc.  
Secretario



Blgo. Humberto Rivera Calle, M.Sc.  
Vocal



## ACTA DE SUSTENTACIÓN 071 - 2019-UI-FC-UNP

### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **"IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE ALGINATOS EN *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) Y *Sargassum* sp. (Fucales)"**, presentada por la señorita Bachiller **ANA BELÉN AMAYA CHUYES**, con el asesoramiento de la **Mchlgo. María Dorothy Torres de León**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

**APROBADA (X)**

**DESAPROBADA ( )**

Con la mención de:

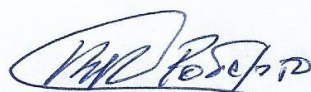
*SOBRESALIENTE*

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLÓGO**.

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLÓGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 07 de noviembre de 2019.

**UNP**

  
**Dr. ROBERTO MENDOZA RENDÓN**  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

  
**Mchlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MS.c.**  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

  
**Blgo. HUMBERTO RIVERA CALLE, MS.c.**  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla  
PIURA - PERU

***Dedicada a:***

*Mi madre Luz Chuyes Sánchez,*

*a mi padre Alejandro Amaya Valencia,*

*a mis hermanos Diana y Dennys,*

*a mi abuelito Alfredo Chuyes.*

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Innóvate Perú, de acuerdo al contrato 352-PNICP-PIAP-2014

A Marcel Gutiérrez Correa Ph.D. fundador del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa” de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), por aceptar ser co-asesor del proyecto de tesis y darme la oportunidad de ingresar al LMB, gracias Doctor por el constante apoyo a jóvenes investigadores, donde se encuentre INFINITAS GRACIAS.

A Gretty Villena Chavéz Ph.D. Directora e Investigadora principal del laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutierrez-Correa” por el apoyo brindado para culminar la tesis de pregrado.

A la Dra. Patricia Gil Kodaka coordinadora del Proyecto por su constante apoyo en los muestreos de algas y por su apoyo para finalizar el proyecto.

A la profesora Dorotty Torres de León, por aceptar ser mi asesora y por sus innumerables preguntas gracias a su vasta experiencia como docente en la Universidad Nacional de Piura.

A la Dra. Erika Salavarría, por la información brindada, por su constante asesoramiento desde el inicio hasta el final del proyecto lo que permitió culminar de manera satisfactoria la tesis.

A los miembros del jurado por la paciencia otorgada y por las constantes correcciones del informe final de tesis.

A Luz N. Chuyes Sánchez “MI MADRE” por permanecer de manera incondicional y plena en mi vida, gracias a ella por ser ejemplo y guía, por enseñarme a andar, brindarme educación, felicidad y estabilidad emocional, gracias madre por darme el existir y luchar siempre para tener una vida mejor.

A mi padre Alejandro Amaya Valencia por sus consejos y por apoyarme de forma incondicional y constante en mi carrera y a mi hermano Dennys Alexander por cuidar de mí, alentándome siempre a seguir adelante.

A mi hermana y amiga Diana Carolina Amaya Chuyes por cuidarme de manera desinteresada a lo largo de la vida, por apoyarme en los momentos más difíciles a lo largo de la investigación. A mis sobrinas Lu y Edda por ser mi alegría y fortaleza cada mañana, por contagiar ese entusiasmo, bondad y locura que las caracteriza.

A mis compañeros tesisistas de pre-grado, de biología experimental y alumnos de doctorado del Laboratorio de Micología y biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa” por los conocimientos y pautas brindadas para el buen desenvolvimiento dentro del laboratorio.

Un especial y merecido agradecimiento a mis grandes amigas Katherine Garcia “Kato” y Leslie Velarde “Less”. Tesisista de pregrado y doctorado respectivamente del Laboratorio de Micología y biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa”, ya que desde el primer día que nos conocimos formamos una alianza infinita, gracias porque a pesar de la distancia siempre me enseñaron que los problemas tienen infinitas soluciones y que estas soluciones se hallan haciendo CIENCIA, teniendo paciencia y con buena compañía. Gracias por hacer mis días llevaderos dentro y fuera del LMB.

A todos mis compañeros y profesores de la escuela Profesional de Ciencias Biológicas, que de alguna forma apoyaron para culminar mi investigación.



## ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
INDICE DE ANEXOS	XVI
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	20
I. ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA	23
1.1. Descripción de la problemática	23
1.2. Justificación e importancia de la investigación	25
1.3. Objetivos	26
1.3.1. Objetivo general	26
1.3.2. Objetivos específicos	26
1.4. Delimitación de la investigación	27
1.4.1. Delimitación espacial	27
1.4.2. Delimitación temporal	27
1.4.3. Delimitación Económica	27
II. MARCO TEORICO	28
2.1. Antecedentes de la investigación	28
2.2. Bases teóricas	30

2.2.1.	Características de <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Macrocystis integrifolia</i>	30
2.2.2.	Características de <i>Sargassum sp.</i>	30
2.2.3.	Diseño de cebadores	31
2.2.4.	Estandarización del protocolo de extracción de ADN	32
2.2.5.	Cuantificación de ADN	32
2.2.6.	Electroforesis en gel de agarosa	32
2.2.7.	PCR convencional	33
2.2.8.	Análisis bioinformáticos	33
2.2.9.	Sales de alginato	34
2.3.	Glosario de términos básicos	35
2.4.	Marco referencial	36
2.4.1.	Legislación nacional	36
2.5.	Hipótesis	37
2.6.	Definición conceptual y operacional de las variables	38
III.	MARCO METODOLOGICO	39
3.1.	Enfoque y diseño	39
3.2.	Sujeto de la investigación	39
3.3.	Métodos y procedimientos	39
3.3.1.	Fase de campo	39
3.3.1.1.	Área de estudio	39
3.3.1.2.	Muestreo y colecta	40
3.3.2.	Análisis de laboratorio	41
3.4.	Técnicas e instrumentos	42
3.4.1.	Fase de campo	42
3.4.1.1.	Sitios de muestreo y colecta	42
3.4.1.2.	Conservación y preparación de las muestras	42
3.4.2.	Fase de laboratorio	42
3.4.2.1.	Diseño de cebadores algC, algD y algG	42
3.4.2.1.1.	Búsqueda y alineamiento de secuencias	42
3.4.2.1.2.	Diseño de cebadores: Tecnología integrada de ADN – IDT.	44
3.4.2.1.3.	Amplificación de cebadores en PCR in silico.	45

3.4.2.2.	Extracción y estandarización del ADN genómico “Método De Extracción CTAB”	46
3.4.3.	Cuantificación y estimación de la pureza del ADN	47
3.4.4.	Visualización de la integridad del ADN.	47
3.4.5.	Diluciones sucesivas de <i>Macrocystis pirifera</i> (Perú y Chile), <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú) y <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador).	48
3.4.6.	Amplificación a partir de cebadores específicos diseñados en la biosíntesis de alginato.	49
3.4.7.	Secuenciamiento de productos de PCR	50
3.4.8.	Análisis bioinformáticos	50
3.4.9.	Extracción de alginato	51
3.4.10.	Cálculo del rendimiento (R)	52
3.5.	Aspectos éticos	53
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	52
4.1.	Resultados	54
4.1.1.	Extracción de ADN de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú y Chile), <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú) y <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador)	54
4.1.2.	Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	55
4.1.2.1.	Amplificación de marcadores Citocromo Oxidasa I (COX I) y Citocromo Oxidasa II (COXII).	55
4.1.3.	Genes de biosíntesis de alginato: <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú y Chile), <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú) y <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador).	57
4.1.4.	Análisis bioinformáticos	58
4.1.5.	Extracción de alginato	64
4.2.	Discusión	67
V.	CONCLUSIONES	73
VI.	RECOMENDACIONES	74
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
VIII.	ANEXOS	85

## INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG.
<b>Tabla 3.1.</b> Ubicación geográfica de los sitios de muestreo	41
<b>Tabla 3.2.</b> Acciones de secuencias reportadas en El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)	43
<b>Tabla 3.3.</b> Cebadores diseñados para la biosíntesis de alginato	45
<b>Tabla 3.4.</b> Proceso de amplificación de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	49
<b>Tabla 3.5.</b> Mezcla de la reacción en cadena de polimerasa (PCR)	50
<b>Tabla 4.1.</b> Datos del ADN genómico extraído de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú y Chile), <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú) y <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador).	55
<b>Tabla 4.2.</b> Tamaño del producto de genes de biosíntesis de alginato en <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú y Chile) y <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú).	65
<b>Tabla 4.3.</b> Porcentaje de identidad de las secuencias de genes de biosíntesis de alginato en <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú y Chile) y <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú)	66
<b>Tabla 4.4.</b> Datos de la extracción alginato de sodio extraído de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Perú) y <i>Macrocystis integrifolia</i> (Perú) <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador)	67

## INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
<b>Figura 3.1.</b> Diluciones sucesivas	48
<b>Figura 3.2.</b> Proceso de extracción del alginato de sodio	54
<b>Figura 4.1.</b> Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra ADN genómico extraído, <i>Macrocyctis pyrifera</i> (Perú) (Carril N° 1 y 2); <i>Macrocyctis integrifolia</i> (Perú) (Carril N° 3 y 4); <i>Macrocyctis pyrifera</i> (Chile) /Carril N° 5 y 6); y <i>Sargassum sp.</i> (Ecuador) (Carril N° 7 y 8); Marcador (Carril N°9)	55
<b>Figura 4.2.</b> Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra ADN genómico extraído, <i>Macrocyctis pyrifera</i> (Perú) (Carril N° 1-7); <i>Macrocyctis integrifolia</i> (Perú) (Carril N° 9-15); Muestra sin diluir (Carril 2 y 9); diluciones: $\frac{1}{5}$ (Carril 3 y 10), $\frac{1}{25}$ (Carril 4 y 11), $\frac{1}{50}$ (Carril 5 y 12), $\frac{1}{100}$ (Carril 6 y 13), $\frac{1}{125}$ (Carril 7 y 14); Control negativo (Carril 1 y 15); Marcador (Carril 8)	57
<b>Figura 4.3.</b> Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de <i>M. pyrifera</i> (Chile), Muestra sin diluir (Carril 2); diluciones: $\frac{1}{5}$ (Carril 3), $\frac{1}{25}$ (Carril 4), $\frac{1}{50}$ (Carril 5), $\frac{1}{100}$ (Carril 6), $\frac{1}{125}$ (Carril ); Control negativo (Carril 1); Marcador 50bp (Carril 8)	57

- Figura 4.4.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Sargassum sp.* (Ecuador); Muestra sin diluir (Carril 2); diluciones:  $1/5$  (Carril 3),  $1/25$  (Carril 4),  $1/50$  (Carril 5),  $1/100$  (Carril 6),  $1/125$  (Carril 7); Control negativo (Carril 1); Marcador 50bp (Carril 8) 57
- Figura 4.5.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Macrocystis pyrifera* (Mp) y *Macrocystis integrifolia* (Mi) (Perú): algC (Carril 2 y 3), algD (Carril 5 y 6) y algG (Carril 8 y 9); Control negativo (C-) (Carril 4 y 7); Marcador 50bp (Carril 1) 58
- Figura 4.6.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Macrocystis pyrifera* (Chile): algC (Carril 1), algD (Carril 2) y algG (Carril 3); Control negativo (Carril 4); Marcador 50bp (Carril 5). 58
- Figura 4.7.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Sargassum sp.* (Ecuador), no se obtuvo producto de PCR; Marcador 50bp (Carril 1) 59
- Figura 4.8.** Alineamiento múltiple para el gen algC de cuatro algas pardas. La última línea muestra la secuencia consenso, donde los asteriscos indican posiciones completamente conservadas, los bloques negros indican regiones parcialmente conservadas, los bloques en blanco indican extensión de gaps. 61
- Figura 4.9.** Alineamiento múltiple para el gen algD de cuatro algas pardas. La última línea muestra la secuencia consenso, donde los asteriscos indican posiciones completamente conservadas, los bloques negros indican regiones parcialmente conservadas, los bloques en blanco indican extensión de gaps. 62

- Figura 4.10.** Alineamiento múltiple para el gen algG de cuatro algas pardas. La última línea muestra la secuencia consenso, donde los asteriscos indican posiciones completamente conservadas, los bloques negros indican regiones parcialmente conservadas, los bloques en blanco indican extensión de gaps. 63
- Figura 4.11.** Gráfico alineamiento múltiple del gen algC. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen algC de *Saccharina japonica* con un total de 1880 pares de bases (pb), las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 213, 214 y 213 pares de bases (pb) respectivamente. 64
- Figura 4.12.** Gráfico alineamiento múltiple de algD. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen algD de *Saccharina japonica*, con un total de 960 pares de bases (pb), las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 459, 425 y 451 pares de bases (pb) respectivamente. 64
- Figura 4.13.** Gráfico alineamiento múltiple de algG. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen algG de *Saccharina japonica*, con un total de 1505 pares de bases (pb) y la secuencia parcial de *Laminaria digitata* con 985 pb además de las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 552, 550 y 550 pares de bases (pb) respectivamente 65
- Figura 4.14.** Fibras de alginato de sodio de *Macrocystis pyrifera* (A), *Macrocystis integrifolia* (B) y *Sargassum sp.* (C); Esferas de alginato de sodio gelificadas con cloruro de sodio 0.5M. 66



**Figura 4.15.** Esferas de alginato de sodio (Industrial) (A), esferas de alginato de sodio 67  
extraído en laboratorio (B), ambas gelificadas con cloruro de sodio 0.5M.

## INDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁG
<b>ANEXO 1.</b> Muestras conservadas en silica gel de <i>Macrocystis pyrifera</i> , en la zona del Bio-Bio – Chile.	86
<b>ANEXO 2.</b> Colecta de <i>Sargassum sp.</i> en Santa Elena-Ecuador.	87
<b>ANEXO 3.</b> Colecta de <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Macrocystis integrifolia</i> en San Juan de Marcona – Ica.	88
<b>ANEXO 4.</b> Diseño de cebadores algC, algD y algG	89
<b>ANEXO 5.</b> Protocolo descrito por Doyle&Doyle 1990	91
<b>ANEXO 6.</b> Procedimiento de extracción de ADN genómico, siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle 1990.	92
<b>ANEXO 7.</b> Preparación de Gel de agarosa al 1%	94
<b>ANEXO 8.</b> Preparación de BUFFER TAE 50X	95
<b>ANEXO 9.</b> Protocolo de Camacho & Hernández-Carmona 2012 “Extracción de alginato sodio”	95
<b>ANEXO 10.</b> Extracción de alginatos - Camacho & Hernández-Carmona (2012)	96
<b>ANEXO 11.</b> Lectura en Nanodrop 2000 thermo scientific	98
<b>ANEXO 12.</b> Extracción de ADN Protocolo original y estandarizado.	99
<b>ANEXO 13.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algC	100

en *Macrocystis pyrifera*

<b>ANEXO 14.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algC en <i>Macrocystis integrifolia</i>	100
<b>ANEXO 15.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algD en <i>Macrocystis pyrifera</i>	101
<b>ANEXO 16.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algD en <i>Macrocystis integrifolia</i>	101
<b>ANEXO 17.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algG en <i>Macrocystis pyrifera</i>	102
<b>ANEXO 18.</b> Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen algG en <i>Macrocystis integrifolia</i>	102
<b>ANEXO 19.</b> Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de alginato en bacterias ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) y algas pardas ( <i>Ectocarpus siliculosus</i> ). (Michael et al., 2010)	103
<b>ANEXO 20.</b> Posición de los Ectocarpales (en negrita) dentro de las algas pardas (Adaptado de Kawai et al., 2007).	104
<b>ANEXO 21.</b> Extracción de ADN genómico <i>Sargassum sp</i> (Fucales), muestras colectadas en Ecuador.	104
<b>ANEXO 22.</b> Extracción de ADN genómico <i>Macrocystis pyrifera</i> (Laminariales), muestras colectadas en Chile.	105
<b>ANEXO N° 23.</b> Extracción ADN genómico <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>M. integrifolia</i> (Laminariales), muestras colectadas en Perú.	107

## RESUMEN

El estudio se llevó a cabo en Lima-Perú, con muestras biológicas de los países: Perú, Chile y Ecuador, donde se colectó *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp.* (Fucales). Se analizó y estandarizó el protocolo de extracción CTAB reportado por Doyle&Doyle 1990, la cantidad y calidad de ADN fue medido por espectrofotometría, mientras que la integridad se observó a través de electroforesis al 1% en gel de agarosa, para identificar genes de biosíntesis de alginato se realizaron búsquedas de secuencias homólogas de dichos genes (algC, algD y algG), los cebadores se diseñaron a partir de secuencias de *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata* y *Saccharina japonica*, se utilizó la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la identificación de los genes algC, algD y algG utilizando el ADN molde de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.*, los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en los laboratorios de Macrogen (Seúl, Corea), editados y analizados con ayuda del programa bioinformático BIOEDIT. Finalmente se extrajo alginato de sodio a partir de frondas de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.* La ruta de biosíntesis de alginato ha sido estudiada en *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata* y *Saccharina japonica* donde se encontró que los genes algC, algD y algG están involucrados en la biosíntesis del alginato, codificando las enzimas: Phosphomanomutasa (PMM), GDP-manosa-deshidrogenasa (GMD) y Manurano-C5-epimerasa (MC5E) respectivamente. A través de PCR convencional se demostró que *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* comparten los genes algC, algD y algG, estos genes están involucrados en la biosíntesis del alginato, pero no se obtuvo producto de PCR en *Sargassum sp.*, sin embargo se demostró fenotípicamente que *Sargassum sp.*, *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia* sintetizan alginato de Sodio.

Palabras clave: Alginato, alga parda, biosíntesis, cebadores, secuenciamiento.

## ABSTRACT

The study was carried out in Lima-Peru, with biological samples from the countries: Peru, Chile and Ecuador, where it was collected, *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) and *Sargassum sp.* (Fucales) The CTAB extraction protocol reported by Doyle & Doyle 1990 was analyzed and standardized, the quantity and quality of DNA was measured by spectrophotometry, while integrity was observed through 1% agarose gel electrophoresis, to identify alginate biosynthesis genes homologous sequences of these genes (algC, algD and algG) were searched, the primers were designed from sequences of *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata* and *Saccharina japonica*, the polymerase chain reaction (PCR) technique was used to identify the algC, algD and algG genes using the template DNA of *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* and *Sargassum sp.*, the PCR products obtained were sequenced in the MacroGen laboratories (Seoul, Korea), edited and analyzed with the help of the BIOEDIT bioinformatics program. Finally, sodium alginate was extracted from fronds of *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* and *Sargassum sp.* The alginate biosynthesis pathway has been studied in *Ectocarpus siliculosus*, *Laminaria digitata* and *Saccharina japonica* where the algC, algD and algG genes were found to be involved in alginate biosynthesis, encoding the enzymes: Phosphomanomutase (PMM), GDP-mannose-dehydrogenase (GMD) and Manuronan-C5-epimerase (MC5E) respectively. Through conventional PCR it was shown that *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* share the algC, algD and algG genes, these genes are involved in alginate biosynthesis, but no PCR product was obtained in *Sargassum sp.*, however, it was phenotypically demonstrated that *Sargassum sp.*, *Macrocystis pyrifera* and *Macrocystis integrifolia* synthesize sodium alginate.

Keywords: Alginate, brown algae, biosynthesis, primers, sequencing

## INTRODUCCIÓN

Las macroalgas son organismos macroscópicos multicelulares del reino protista, poseen una composición variable de monosacáricos y polisacáridos (Duguet, 2017), las macroalgas fueron clasificadas según sus características fenotípicas en algas verdes, rojas y pardas (Marcartain et al. 2007). Las algas pardas o pertenecientes a la división Phaeophyta corresponden a un grupo grande de algas marinas, en el que no se conoce aún el número exacto de especies. Su pigmentación varía de amarillo pardo a pardo oscuro y produce gran cantidad de un mucus protector (Quitral, 2012).

La principal fuente biológica del alginato son las algas pardas (*Saccharina*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Sargassum*, *Ascophyllum*, etc.) (Swift, Hudgens, Heselpoth, Bales, & Nelson, 2014) y una variedad de bacterias patógenas oportunistas (del género *Pseudomonas* y *Azotobacter*) (Goujon, 2004), el alginato tiene como función biológica proporcionar fuerza y flexibilidad a los tejidos de las algas; con propiedades que son importantes en términos de resistencia a las tensiones mecánicas y como protección de los predadores (Norderhaug, Christie & Rinde, 2002); siendo el alginato uno de los principales componentes estructurales en la pared celular, constituye hasta un 45% del peso seco de las algas pardas (Wang et al., 2014).

El alginato es la sal de ácido algínico, es un polisacárido de cadena recta, hidrófilo y coloidal por ser una familia de copolímeros binarios no ramificados, está compuesto del ácido  $\beta$ -D-manurónico(M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico(G); estos ácidos se encuentran unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos (Draget et al., 2005), este ácido poliurónico normalmente está dispuesto en tres combinaciones de las subunidades del disacárido:  $\alpha$ L-(1-4) gulurónico-gulurónico (GG),  $\alpha$ L-(1-4) manurónico-gulurónico (MG),  $\beta$ D-(1-4) manurónico-manurónico (MM), estas combinaciones se disponen en bloques o alternados en la cadena principal y su proporción en la cadena del polímero depende del tipo de alga (Yagnentkovsky, 2011).

La ruta de biosíntesis de alginato ha sido caracterizada en *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa*, las enzimas involucradas AlgA, AlgC y AlgD, son responsables de la síntesis del ácido GDP-manurónico (precursor del alginato), posteriormente las enzimas Alg8 y Alg44 están involucrados en la polimerización de este compuesto (ácido GDP-manurónico) finalmente la enzima AlgG epimeriza los residuos del ácido D-manuronato en residuos en L-guluronato (Zhang, Shao, Jin, & Duan, 2016).

Los genes involucrados en la producción de alginato en bacterias están agrupados en tres regiones cromosomales diferentes, una de ellas contiene los genes biosintéticos, como algD, que codifica para GDP-manosa 6-deshidrogenasa (GDPMD), aparentemente la enzima clave del camino biosintético; algA, que codifica para una enzima bifuncional con actividades de fosfomanomutasa isomerasa (PMI) y GDPMPP; y algG, involucrado en el proceso de epimerización (Petroni, 1994).

La biosíntesis de alginato en algas pardas involucra reacciones bioquímicas equivalentes a la ruta de biosíntesis de bacterias, pero solo la etapa final de epimerización se ha caracterizado a nivel molecular hasta el momento, de las 13 proteínas involucradas en la biosíntesis de alginato en bacterias, solo tres (fosfomanomutasa (AlgC), el GDP-manosa 6-deshidrogenasa (AlgD) y el MC5-E (AlgG)) han sido inequívocamente identificadas en *Ectocarpus siliculosus* mediante búsquedas de homología (Michel, Tonon, Scornet, Cock, & Kloareg, 2010), *Saccharina japonica* (Chi et al 2017) y *Laminaria digitata* (Nyvall et al. 2003). La mayor parte del conocimiento actual sobre los genes involucrados en la biosíntesis de alginato proviene de sistemas bacterianos, principalmente en géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*, en cuanto a las algas pardas, el estudio se centra principalmente en el análisis de secuenciación del transcriptoma y el genoma (Wang et al., 2014).

La investigación se realizó en las algas pardas *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp.* (Fuciales), provenientes de Perú, Chile y Ecuador, a través de PCR convencional se determinó que *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* comparten los genes algC, algD y algG de la secuencias homologas reportadas en *Ectocarpus siliculosus*, *Saccharina japonica* y *Laminaria digitata*, estos genes están involucrados en la biosíntesis del alginato, no se obtuvo producto de PCR en *Sargassum sp.*, sin embargo se



demonstró fenotípicamente *Sargassum sp.*, *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* sintetizan alginato de Sodio.

## **I. ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA**

### **1.1. Descripción de la realidad problemática.**

Los polisacáridos lineales compuestos de ácido manurónico y los residuos de ácido gulurónico, se denominan alginato, estos polímeros son sintetizados por algas pardas y por especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas*, los alginatos fabricado a partir de algas pardas se utilizan actualmente en diversas aplicaciones industriales y farmacéuticas (Ertersvag et al., 2017), el alginato proveniente de varias fuentes ha mostrado propiedades de gel significativamente diferentes, como la diversidad de tamaño molecular, la relación entre ácido manurónico y el ácido gulurónico (M/G), etc., esto ha formado la base para numerosas aplicaciones en la industria de biomateriales, aplicaciones médicas y avanzadas biotecnologías (Wang et al., 2014).

La mayor parte del conocimiento actual sobre los genes involucrados en la biosíntesis de alginato proviene de sistemas bacterianos, principalmente en géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*, en cuanto a las algas pardas, el estudio se centra principalmente en el análisis de secuenciación del transcriptoma y el genoma (Wang et al., 2014).

En los últimos años, la necesidad de producir alginato con una relación controlable de M / G y propiedades mecánicas controlables (elasticidad y resistencia) es creciente, el alginato-C5-manuronano-epimerasa (proteína AlgG) es la enzima clave que decide la relación M / G de alginato. En el paso final de la biosíntesis de alginato, la proteína AlgG (codificada por el gen *algG*) puede catalizar la conversión los residuos de  $\beta$ -D-manuronato en el sustrato polimérico polimanuronano a residuos de  $\alpha$ -Lguluronato. La eficiencia sintética y actividad enzimática de AlgG son factores vitales que influyen en la conversión de M a G (Wang et al., 2014).

Las algas pardas más conocidas en Chile son *Macrocystis pyrifera* (huairo), *Lessonia nigrescens* (huairo negro), *Durvillaea antarctica* (cochayuyo) (Quitral, 2012). *Lessonia vadosa*

y *Lessonia flavicans*, además de los *Macrocystis*, producen un mucílago llamado ácido algínico, el cual es extraído como alginato de sodio y comercializado a nivel nacional o exportado a otros países (Mansilla & Alveal, s.f.). En Perú, los mayores registros de *Macrocystis pyrifera* se encuentran en la zona centro y sur de nuestro litoral (IMARPE, s.f.).

*Sargassum sp.* tiene importantes aplicaciones comerciales como fuente de alginatos, este hidrocoloide es usado como agente gelificante, espesante o estabilizante y agente emulsificante en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmetológica y biotecnológica (McHugh 1987, Istini *et al.* 1994). Las diferentes especies de *Sargassum* tienen diferente calidad, concentración y propiedades de su alginato, lo que hace su evaluación muy necesaria dada las diversas aplicaciones que cada especie puede tener en la industria (Camacho & Hernández, 2012).

Existen técnicas capaces de producir un enriquecimiento de una secuencia de ADN específica, lo que facilita en gran medida una variedad de manipulaciones analíticas posteriores, como la clonación de secuencias genómicas y detección de ADN genómico, la técnica más revolucionaria de los últimos años ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha dado nuevas alas a la ingeniería genética y a la biología molecular (Godhe, Anderson, & Rehnstam-Holm, 2002).

Diversos estudios han demostrado que la especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentra directamente influenciada por los diversos componentes que integran la técnica: Mezcla de reacción, régimen de ciclaje y ADN polimerasa (Rodríguez & Barrera, 2004). Resulta necesario planificar en cada caso una metodología en la que pueda existir un equilibrio entre estos parámetros, ya que desafortunadamente al ajustar algunas condiciones de la reacción para lograr la mayor especificidad no siempre es compatible con un alto rendimiento, y tratar de optimizar la fidelidad pudiera reducir la eficiencia, tal es el caso, que muchas veces el investigador debe decidir cuál de estos parámetros prefiere sobre otro, viéndose a veces en la necesidad de sacrificar uno por otro según sea el caso (Cha & Thilly, 1993).

En virtud de esta realidad y por el amplio uso de la técnica en el campo microbiológico, urge la necesidad de concienciar sobre la importancia de revisar y optimizar los protocolos de procedimiento para cada determinación que se desee, estudiando en detalle los posibles factores que influyen negativamente, se debe tenerse en cuenta que la efectividad de una PCR es también resultado del trabajo con soluciones puras de ácidos nucleicos, de tal modo que es factible deducir que la sensibilidad de la técnica puede verse dramáticamente reducida cuando se aplica directamente a muestras biológicas (Bolívar et al. 2014).

## **1.2. Justificación e importancia de la investigación.**

Las macroalgas ofrecen un recurso marino accesible y relativamente fácil de cultivar, tienen un papel importante en la provisión de productividad primaria marina, particularmente en zonas de aguas someras, a menudo se descubre que producen cantidades considerables de biomasa (Qin, Jiang, & Tseng, 2005), en el presente el hombre ha incrementado su atención hacia el mar como una fuente potencial de productos químicos y de alimento por lo cual las macroalgas han tomado un papel muy importante (Gojon, 1997), ya que las algas marinas son consideradas por la industria como fuente de extracción de productos básicos entre ellos tenemos agar, carragenanos y alginatos (Yabur, 2005),

La mayor parte de la producción de alginato mundial es a partir de macroalgas, principalmente de *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens* y *Durvillaea antarctica*, siendo los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum* los más importantes en términos productivos, debido a la variedad del alga, estacionalidad, condiciones de cultivo, fracción de la planta, composición y concentración de alginato (Lagos, 2016). Las algas marinas como *Macrocystis* y *Sargassum*, tienen un valor económico adicional porque contienen compuestos (algínico, laminarina y manitol) con propiedades coloidales, que se usan en las industrias de la nutrición humana, los tejidos y el tratamiento del agua (Vega et al. 2006).

El alginato se ha colocado como el segundo biopolímero derivado de algas con mayor demanda en el industria de hidrocoloides (Rhein, et al., 2015). Actualmente, la forma de obtener alginato comercial, utilizado para la mayoría de las aplicaciones industriales es a través de su extracción de algas marinas. Dado que el alginato es un polisacárido biodegradable, está presente en alimentos, productos farmacéuticos, aplicaciones biotecnológicas, en las industrias alimenticias y farmacéuticas, además el alginato se usa principalmente como agente estabilizador, espesante o gelificante (Gacesa, 1998 & Sabra, et al., 2011), en medicina se usa como material de curación de heridas (Hoefler, et al., 2015), como parte de tratamientos médicos ó como suplementos dietéticos de fibra (Venkatesan, et al., 2015). El alginato mostró efectos fisiológicos beneficiosos en el tracto gastrointestinal (Dettmar, et al., 2011). Además, se están investigando alginatos de hidrogel en biotecnología como agentes de administración de fármacos, como encapsulación celular material, y como material de andamio en ingeniería de tejidos (Pacheco, 2016).

En consecuencia, un mayor conocimiento sobre el mecanismo molecular involucrado en la biosíntesis de alginato será crucial para el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar el producción de alginatos con características definidas para aplicaciones específicas (Pacheco, 2016).

### **1.3. Objetivos.**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Identificar los genes algC, algD y algG de biosíntesis de alginatos en *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp.* (Fucales).

### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Diseñar cebadores de biosíntesis de alginato en algas pardas (Búsqueda de secuencias, alineamiento múltiple, diseño y síntesis de cebadores)
- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN reportado por Doyle & Doyle en 1990
- Obtener productos de PCR para los genes algC, algD y algG, a través del protocolo de PCR convencional.
- Realizar análisis bioinformáticos de los productos de PCR de los genes algC, algD y algG de biosíntesis de alginato.
- Extraer alginato de Sodio a partir de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) y *Sargassum sp.* (Fucales).

## **1.4. Delimitación de la investigación.**

### **1.4.1. Delimitación espacial.**

En Perú-Ica, se colectó *Macrocystis pyrifera* en Bahía San Nicolás y *Macrocystis integrifolia* en Punta San Juanito, en Chile- Región del Bio Bio, se colectó *Macrocystis pyrifera* y en Ecuador-Santa Elena se colectó *Sargassum sp.*

### **1.4.2. Delimitación temporal.**

Esta investigación se realizó durante octubre del 2017 y junio del 2018, con muestras de algas de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.*, en puntos específicos de tres países de América del Sur (Perú, Chile y Ecuador).

### **1.4.3. Delimitación Económica.**

Para efectos de la investigación se usó el aporte económico de Innóvate Perú de acuerdo al contrato 352-PNICP-PIAP-2014 y el aporte del Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa” de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para ejecutar y culminar dicha investigación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación.

En 1883, el químico inglés E. C. C. Stanford, por digestión de frondas de ciertas algas pardas con carbonato sódico, obtuvo una masa gelatinosa que evaporada a sequedad presentaba "aspecto algo semejante a la goma tragacanto". A esta nueva sustancia su descubridor le dió el nombre de "algina", derivado de alga. Este término se usó en un principio para designar la sustancia in situ en la planta; mientras que a los distintos productos comerciales que se obtuvieron posteriormente se les dio otras acepciones: ácido algínico, alginatos solubles y compuestos algínicos en general (Ramírez, 2016).

Estudios en genómica estructural y funcional utilizando *Ectocarpus siliculosus* y *Saccharina japonica* han analizado las vías de las rutas de biosíntesis de alginato, los genes se habían predicho en base a las rutas sintéticas del alginato bacteriano, entre estos genes en algas pardas, solo una GDP-manosa 6-deshidrogenasa (GMD1) de *E. siliculosus* y varias epimerasas C5 de manuronato (MC5E) de *Laminaria digitata* habían sido aislados y confirmados (Chi et al 2017).

El precursor del alginato en algas pardas es el ácido GDP-manurónico (GDP-ManA). El GDP-ManA se obtiene mediante una oxidación de cuatro electrones de GDP-manosa (GDP-Man), la enzima GDP-manosa deshidrogenasa, cataliza la reacción  $\text{GDP-Man} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow \text{GDP-ManA} + \text{NADH}$ , esta enzima se purificó y caracterizó por primera vez a partir de *Pseudomonas* (Tenhaken et al., 2011). Zhang et al., 2016, indicó que la enzima GDP manosa 6-deshidrogenasa (GMD) ha sido considerada como el limitante de la velocidad en la vía de síntesis del alginato, en genomas bacterianos GMD es una sola copia del gen, mientras que en *E. siliculosus*, existe como un gen multicopia, además en el transcriptoma de *S. japonica* dos genes GMD han sido aislados llevándose a cabo un análisis funcional, donde se espera arrojar luz sobre las estructuras de GMD y sus posibles roles en la adaptación de las algas pardas a las tensiones ambientales, para enriquecer aún más nuestra comprensión sobre la síntesis de alginato en algas pardas.



Trabajos reportados para la enzima fosfomanomutasa (PMM), indican que está involucrada en la biosíntesis de polisacáridos que contienen manosa, incluyendo alginato y fucoidanos, la enzima fosfomanomutasa cataliza la reacción de interconversión de manosa-6-fosfato (M6P) a manosa-1-fosfato (M1P) a través de un 1,6-difosfato de glucosa (Zhang et al., 2018), Manosa-1-fosfato es el sustrato usado en la síntesis de GDP-manosa, esta proteína está involucrada en las modificaciones post traduccionales (Feng et al., 2014), GDP-manosa es también un nucleótido esencial de glucosa en vegetales, siendo vital para la síntesis de polisacáridos de pared celular que contienen D-manosa (Qian et al., 2007).

El paso final de la ruta biosintética del alginato en algas pardas, es la epimerización de los residuos D-manurano en residuos L-gulurónicos dentro de la cadena polimérica (Tonon et al., 2008); esta reacción es catalizada por la enzima manuronano C-5 epimerasa, donde juega un papel central, puesto que proporciona tanto resistencia como flexibilidad al tejido de algas (Nyvall et al., 2003); la enzima manuronano C-5 epimerasa, se encontró por primera vez en la producción de alginato bacteriano de *Azotobacter vinelandii* por Haug y Larsen en 1971, más tarde un estudio similar a la actividad enzimática se demostró en distintas algas pardas (Indergaard & Skjatk-Braek, 1987).

Inoue & Ojima en 2018 identificaron los genes candidatos que codifican isozimas de manuronano C5-epimerasa (MC5E). MC5E es una enzima que epimeriza el residuo M a un residuo G en el polimannuronano y determina la secuencia de M y G en alginato. En consecuencia, 31 y 105 de dichos genes candidatos se identificaron en los genomas de *E. siliculosus* y *Saccharina japonica*, respectivamente. Se cree que estos múltiples MC5E contribuyen a la producción de moléculas de alginato con una variedad de secuencias M / G, por el contrario, *P. aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii* sólo tienen un (AlgG) y siete (AlgE1–7) MC5E, este es el primer descubrimiento de este tipo hecho para un eucariota de biosíntesis de alginato y avanza la comprensión del metabolismo del alginato en el principal productor de alginato en algas pardas.

## **2.2. Bases teóricas.**

### **2.2.1. Características de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia***

Macrocystis es una de las algas marinas más grandes y conocidas, con estipes más delgados de más de 30 m de longitud, poseen frondas lanceoladas subtendidas por neumatocistos. Macrocystis es un género predominante del Océano Pacífico con poblaciones en agua fría, se ha reportado en Sur América, en Nueva Zelanda, Australia y alrededor el hemisferio sur. Al sur posee una latitud de 35°S aproximadamente, incluyendo el sur de África. Actualmente se han descrito cuatro especies del género Macrocystis, estos son: *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis angustifolia* y la relativamente nueva Especie *Macrocystis laevis* (Gojon, 1997).

Se distinguió fácilmente dos especies de Macrocystis basadas en características morfológicas; *Macrocystis integrifolia* posee fascículos (aerocisto) planos y frondas estrechas, mientras que *Macrocystis pyrifera* posee frondas anchas (Macaya et al., 2005). Las muestras de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia* fueron identificadas según sus características morfológicas (Disco adhesivo, frondas) (Salavarría, 2014). Los individuos fueron desprendidos de las rocas con una barreta, separando el rizoide (disco adhesivo) del sustrato.

### **2.2.2. Características de *Sargassum* sp.**

Las especies de Sargassum frecuentemente constituyen la más abundante cobertura de algas tropicales y subtropicales (Núñez & Casas, 1995). En el pacifico oriental, región comparativamente pobre en *Sargassum*, se registran varias especies desde Isla Guadalupe en México hasta Islas Galápagos, Taylor (1945) lo hace desde Baja California hasta Ecuador incluyendo el archipiélago de Colón en Islas Galápagos (Camacho, 2003). Las especies bentónicas de *Sargassum* constituyen un hábitat ecológico importante en muchas regiones costeras tropicales y templadas. Este género usualmente constituye grandes praderas en áreas rocosas intermareales y submareales, donde juega un papel fundamental en el ciclo de vida de la fauna asociada y otras algas (Camacho & Carmona, 2012).

Las especies de *Sargassum* son macroalgas comunes en todo el mundo y un posible recurso marino renovable debido a su gran abundancia. La producción de alginato de *Sargassum* tiene cuatro ventajas, en primer lugar, es un recurso marino renovable; segundo esta especie de macroalgas crece cerca de la costa; Por lo tanto, su colección es mucho más fácil en comparación con otras macroalgas; tercero, la producción de alginato de esta macroalga es actualmente menor que otras fuentes de alginato, ya que no hay demanda del mercado. Finalmente, el alginato de *Sargassum* tiene diferentes composiciones químicas, biotecnológicamente potenciales (Yabur, 2005).

### **2.2.3. Diseño de cebadores**

El diseño cuidadoso de cebadores es uno de los aspectos más importantes de la PCR. Cebadores mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los buscados (amplificación inespecífica) (Osorio & Tapiero, 2014). En el diseño de los mismos algunas reglas se han demostrado como útiles, por ejemplo:

- Cada cebador individual debe contar con una longitud de 18-24 bases.
- Se debe mantener un contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60%.
- Los dos cebadores del par deben de tener temperatura de fusión “T<sub>m</sub>” cercanos, dentro de los 5°C.
- La secuencia de los cebadores individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.
- Evitar poli X.
- Secuencias adicionales pueden ser agregadas en el extremo 5’ del cebador (no incluir cuando se estima la T<sub>m</sub> del cebador).
- Se pueden agregar degeneraciones en algunas posiciones del cebador:
  - a) Se incrementa el riesgo de amplificación inespecífica.
  - b) Se disminuye la concentración en la mezcla de cada uno de los cebadores posibles
  - c) No se recomienda utilizar más de 64 cebadores diferentes en la mezcla.

#### **2.2.4. Estandarización del protocolo de extracción de ADN**

El objetivo de estandarizar un protocolo de extracción de ADN es obtener un ADN integro, de gran cantidad y altamente puro. Su aplicación debe ser rápida, sencilla y de bajo costo. Esto se logra mediante la estandarización de cuatro pasos fundamentales para extraer el ADN de las células (Quinga, 2012).

#### **2.2.5. Cuantificación de ADN**

Luego de la extracción del ADN, es necesario la cuantificación y el análisis de la calidad de las moléculas obtenidas. Uno de los métodos más utilizados para la cuantificación del ADN es el análisis de la absorción UV, ya que los nucleótidos poseen máximos de absorción alrededor de 260 nm (por ejemplo, dATP: 259 nm; dCTP: 272 nm; dTTP: 247 nm). Este método proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de una muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas. Para evaluar la pureza de la muestra debe determinarse la proporción OD 260nm/OD 280nm. Si la relación es mayor a 1,7 puede estimarse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica (Gómez et al, 2017).

#### **2.2.6. Electroforesis en gel de agarosa**

La calidad de las moléculas extraídas se analiza por electroforesis en gel de agarosa. La agarosa es un polisacárido altamente purificado derivado del agar. Se utiliza para separar macromoléculas tales como ácidos nucleicos y grandes complejos proteicos. Tienen un menor poder de resolución que la poliacrilamida pero una gran rango de separación, tal que pueden ser separadas moléculas de ADN desde 200 pb hasta aproximadamente 50.000 pb (variando las concentraciones de agarosa) (Gómez et al, 2017).

El tamaño del poro del gel puede ser predeterminado ajustando su concentración en el gel; entonces a mayor concentración menor tamaño de poro, el rango del gel es

aproximadamente entre 0,7% y 2% p/v. Con un gel 0,7% se obtiene una buena separación (resolución) de grandes fragmentos de ADN (5–10kb) y con uno 2% se resuelven mejor los fragmentos pequeños (0.2–1kb). Hay que tener en cuenta que los geles de bajo porcentaje son muy frágiles y se pueden romper al intentar levantarlas, y los de alto porcentaje suelen opacarse mucho, disminuyendo la visibilidad de las bandas. En líneas generales, 1% es una concentración estándar (Rodríguez, 2014).

#### **2.2.7. PCR convencional**

Existen técnicas capaces de producir un enriquecimiento de una secuencia de ADN específica, lo que facilita en gran medida una variedad de manipulaciones analíticas posteriores, como la clonación de secuencias genómicas y detección de ADN genómico, la técnica más revolucionaria de los últimos años ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha dado nuevas alas a la ingeniería genética y a la biología molecular, esta técnica fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80 (Godhe, Anderson, & Rehnstam-Holm, 2002).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos específicos, fundamental para la biología molecular y es la técnica molecular práctica más importante para el laboratorio de investigación (Moreno, 2012). La técnica de PCR utiliza ciclos de temperatura para impulsar ciclos repetidos de síntesis de ADN para generar grandes cantidades de ADN, en proporción a la cantidad original de ADN molde. Las hebras de ADN molde se amplifican mediante los ciclos repetidos de dos o tres etapas de temperatura que incluyen: desnaturalización térmica, hibridación y la etapa de extensión (Ting, Daigle, Chen, & Feng, 2014).

#### **2.2.8. Análisis bioinformáticos**

La bioinformática consiste en entender las correlaciones, estructuras y los patrones en los datos biológicos. En los últimos años, la Bioinformática ha atraído la conjugación de varias disciplinas, entre las que están la informática, las matemáticas, la estadística, la química y las ciencias biológicas no tradicionales. Esto se debe a la disponibilidad de enormes cantidades de

datos biológicos públicos y privados, y a la necesidad imperiosa de transformar datos en información biológica útil y en conocimiento (Meneses et al, 2011).

La aplicación de estas disciplinas con técnicas computacionales inteligentes, sirven para la creación de proyectos que conlleven el descubrimiento y desarrollo de fármacos, análisis del genoma y control biológico, entre otros. Esto implica el uso de tecnologías informáticas y métodos estadísticos para manejar y analizar un gran volumen de datos biológicos sobre el ADN, el ARN y las secuencias de proteínas, estructuras de las proteínas, los perfiles de expresión genética y las interacciones de la proteína (Meneses et al, 2011).

#### **2.2.9. Sales de alginato**

Entre las sales de alginato más empleadas se han encontrado la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y característica transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funami et al., 2009). También, se han desarrollado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de propilenglicol empleado en la fabricación de cervezas y aderezos para ensaladas por su alta solubilidad a bajos pH. Así como otras dos nuevas familias, los derivados de la sal de amonio cuaternaria del ácido algínico y los obtenidos de injertos con acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables (Helgerud et al., 2010).

En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la temperatura, aspecto que lo ha hecho atractivo en la elaboración de cremas, quesos, salsas, y aderezos. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentado como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel (Lupo et al., 2012).

### **2.3. Glosario de términos básicos.**

**Ac. Algínico:** Es un compuesto químico que se encuentra en la pared celular de las algas marinas pardas (feofíceas).

**ADN:** Moléculas del interior de las células que contienen información genética y la transmiten de una generación a otra. También se llama ácido desoxirribonucleico.

**Alga parda:** constituyen la división Feófitos, un grupo grande y conspicuo que contiene unos 260 géneros y alrededor de 2.000 especies, la pared celular está constituida por una capa interna de celulosa, robusta y fibrilar y una capa externa amorfa, mucilaginoso, polisacáridos carboxilados (ácido algínico) y sulfatados (fucoidano), denominados ficocoloides, también se encuentran en la matriz de la pared celular.

**Alginato:** Son sales de ácido algínico que pueden ser formadas por Na, K, Mg, Ca, entre otros formando sales con diferentes grados de solubilidad en agua, lo cual confiere diversos grados de viscosidad.

**algC:** Es el gen responsable de codificar la enzima fosfomanomutasa.

**algD:** Es el gen responsable de codificar la enzima GDP-manosa 6-deshidrogenasa.

**algG:** Es el gen responsable de codificar la enzima Manuronano C-5 epimerasa (MC5E).

**Alineamiento múltiple:** Es un alineamiento de tres o más secuencias biológicas, generalmente proteínas, ADN o ARN.

**Bioinformática:** Campo de la ciencia en el cual confluyen varias disciplinas tales como: biología, computación y tecnología de la información. El fin último de este campo es facilitar el descubrimiento de nuevas ideas biológicas así como crear perspectivas globales a partir de las cuales se puedan discernir principios unificadores en biología.



**Cebador:** Un iniciador o cebador es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada, también se les conoce como oligonucleótidos.

**Genes:** Son las unidades de almacenamiento de información genética, segmentos de ADN que contienen la información sobre cómo deben funcionar las células del organismo.

**GMD:** Enzima GDP-manosa 6-deshidrogenasa.

**M/G:** Ácido manurónico y el ácido gulurónico.

**MC5E:** Enzima Manuronano C-5 epimerasa (MC5E).

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.

**PMM:** Enzima fosfomanomutasa.

**Polisacáridos:** Son biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuentran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

## **2.4. Marco referencial.**

### **2.4.1. Legislación nacional**

- **Artículo 6º.- DE LAS NORMAS DE ACCESO A LA ACTIVIDAD PESQUERA**

- a. El acceso a la actividad pesquera de las macroalgas marinas se obtiene a través de los permisos de pesca y, en su caso, de la autorización de instalación y/o la licencia para la operación de plantas de procesamiento.
- b. Los permisos de pesca para realizar la actividad extractiva o de recolección de las macroalgas marinas del medio natural, al tratarse de una actividad pesquera artesanal, son otorgados por las dependencias con competencia pesquera de los Gobiernos Regionales para el ámbito de su jurisdicción, cumpliendo con lo dispuesto en el Capítulo II del Título III y en el artículo 121° del Título IX del Reglamento de la Ley General de Pesca aprobado por Decreto Supremo N° 012-2001-PE.

- **Artículo 7º.- DE LA VIGILANCIA Y CONTROL**

- a. La Dirección General de Seguimiento Control y Vigilancia, en el marco de la conformación de los Comités Regionales de Vigilancia de la Pesca Artesanal (COREVIPAS) aprobada por Resolución Ministerial No 045-2003 PRODUCE, coordinará con las dependencias regionales con competencia pesquera de los Gobiernos Regionales la realización de acciones de vigilancia y control, con la participación de las organizaciones sociales representativas de pescadores artesanales de algas marinas de sus respectivas localidades.
- b. Con la finalidad de facilitar el monitoreo, seguimiento y vigilancia de la pesquería de macroalgas marinas, la Oficina General de Informática y Estadística del Ministerio de la Producción - OGTIE, coordinará con las dependencias regionales con competencia pesquera de los Gobiernos Regionales y/o el IMARPE la realización de una encuesta anual sobre los aspectos pesqueros y socioeconómicos de esta actividad.

## **2.5. Hipótesis.**

Los genes algC, algD y algG implicados en la biosíntesis de alginato, se encuentran presentes en las algas *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Laminariales) provenientes de Perú y Chile y *sargassum spp* (Fuciales) proveniente de Ecuador.

## **III. MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1. Enfoque y diseño.**

Cualitativo: Proceso de construcción y comprobación teórica desde una perspectiva holística, pues se trata de comprender el conjunto de cualidades interrelacionadas que caracterizan a un determinado fenómeno. La perspectiva cualitativa de la investigación intenta acercarse a la realidad social a partir de la utilización de datos no cuantitativos

### **3.2. Sujeto de la investigación.**

Las muestras biológicas fueron provenientes de tres especies de algas pardas: *Macrocystis pyrifera* (Colectado en Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Colectado en Perú) y *Sargassum sp* (Colectado en Ecuador).

### **3.3. Métodos y procedimientos.**

#### **3.3.1. Fase de campo**

##### **3.3.1.1. Área de estudio:**

La presente investigación se realizó en distintas localidades de tres países costeros: Perú-Ica (San Juan de Marcona), Chile-Región del Bío Bío (VIII) y Ecuador-Provincia de Santa Elena.

En el distrito de San Juan de Marcona se encuentran las localidades de: Bahía San Nicolás, Los bancos y Punta San Juanito. Esta zona está influenciada por el Sistema de Corrientes Peruanas o Sistema de la Corriente de Humboldt (SCH), de aguas frías provenientes del sur, que abarca desde los 4° latitud sur, hasta Chile; siendo Marcona uno de los principales lugares de afloramiento en el mundo (Salavarría, 2014).

La Región del Biobío se encuentra ubicada en la zona centro-sur de Chile. Limita por el norte con la Región del Maule, por el sur con la Región de la Araucanía, por el este con Argentina y al oeste con el océano Pacífico. Posee una superficie de 37.068,7 km²,

representando el 4,9% del territorio chileno americano e insular (Fundación para la Innovación Agraria, 2016).

La principal característica Provincia de Santa Elena – Ecuador, es que se encuentra al borde de la costa del Océano Pacífico, y su relieve, en el centro y oeste del territorio es de poca variación, el clima tiene una variación entre tropical húmedo y tropical seco, la temperatura media anual se encuentra entre los 23.5 y 25.2 °C, llegando a temperaturas máximas de 32°C en la estación de invierno y las mínimas son del orden de 16°C., en los meses de julio a septiembre (Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Santa Elena, 2019).

### 3.3.1.2. Muestreo y colecta

En el Departamento de Ica-Perú, se realizaron muestreos en dos localidades (Bahía San Nicolás y Punta San Juanito), las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron extraídas de Bahía San Nicolás mientras que *Macrocystis integrifolia* fue extraída de Punta San Juanito (Anexo 3) dichas zonas fueron georreferenciadas con un GPS (sistema de posicionamiento Global) marca Garmin (Tabla 3.2.). Para el ingreso a los puntos de muestreos se utilizó una embarcación pequeña; la colecta submareal se realizó con la ayuda de un buzo profesional. (Salavarría, 2014).

Las muestras provenientes de Chile (Región IV del Bío Bío) (Anexo 1), y Ecuador (Provincia de Santa Elena) (Anexo 2), fueron colectadas por los Doctores Macaya y Salavarría respectivamente.

**Tabla 3.1.** Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.

PAIS	LOCALIDAD	COORDENADAS	ESPECIE
------	-----------	-------------	---------

		LS	LW	
PERÚ	Bahía San Nicolás	S 15°13'58.1"	W 75°13'18.5"	<i>M. pyrifera</i>
	Punta San Juanito	S 15°14'43.2"	W 75°15'31.9"	<i>M. Integrifolia</i>
CHILE	Región Bío Bío	S 36°48'21.03"	W 73°10'39.09"	<i>M. pyrifera</i>
ECUADOR	Santa Elena	S 2°12'24.24"	W 80°52'50.58"	<i>Sargassum sp.</i>

### 3.3.2. Análisis de laboratorio

Se procedió a la extracción de ADN genómico, se estandarizó el protocolo de Doyle&Doyle 1990, realizando homogenización mecánica y homogenización química. Para la homogenización mecánica se maceró la muestra con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino (Salavarría, 2014), el nitrógeno líquido congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación (Velázquez, Aragón, & Romero, 2008). La homogenización química se realizó mediante el protocolo de extracción CTAB (CTAB al 2% (p / v), EDTA 50 mM pH 8.0; Tris-HCl 100 mM pH 8.0; NaCl 1,4 M y 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol y PVP insoluble (Añadidos justo antes del uso); se utilizó SEVAG (25:24:1 (v/v) fenol: cloroformo: alcohol isoamílico), etanol absoluto, 70% de etanol, RNase A (4 mg/ml) y agua estéril) (Rat et al., 2014).

La cuantificación del material genético se obtuvo por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000, Thermo Scientific. Se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando las condiciones de 50 V durante 30 min y GelRed 30X para visualizarlo en de luz (MAESTROGEN), con luz UV a 302 nm., utilizando buffer de corrida TAE 1X (Ver Anexo 6 y 7) (Mendoza-Carrión, 2003).

Para la amplificación de productos de PCR, se realizó diluciones sucesivas del ADN molde. Los productos de PCR, fueron enviados a Macrogen (Seúl, Corea), las secuencias obtenidas fueron analizadas con Software bioinformáticos.

Finalmente se extrajo alginato de sodio de las tres especies de algas pardas *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp* y se comprobó la propiedad gelificante del alginato extraído.

### **3.4. Técnicas e instrumentos**

#### **3.4.1. Fase de campo**

##### **3.4.1.1. Sitios de muestreo y colecta**

Se colectó 10 individuos de *Macrocystis* al azar en un área mayor a  $200m^2$  (Macaya, 2010); se tomaron muestras a dos profundidades diferentes a cero metros se colectó 5 individuos de *Macrocystis integrifolia* en Punta San Juanito, a diez metros se colectó 5 individuos de *Macrocystis pyrifera* en Bahía San Nicolás.

##### **3.4.1.2. Conservación y preparación de las muestras**

Se utilizó frondas en buenas condiciones (libres de epífitas o epibiontes). Se cortó cuadrados de 2-3  $cm^2$ . (Anexo 3) Se lavó con agua de mar y se secó con papel toalla; posteriormente se colocaron en bolsas ziploc contenidas con silica gel (Macaya, 2010; Salavarría, 2014). Las muestras fueron trasladadas a Lima al Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez-Correa” (LMB-MGC) de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

#### **3.4.2. Fase de laboratorio**

##### **3.4.2.1. Diseño de cebadores algC, algD y algG (Anexo 4).**

###### **3.4.2.1.1. Búsqueda y alineamiento de secuencias.**

###### **➤ Búsqueda de secuencias**

Se recopiló un total de 24 secuencias (algC, algD y algG) de genes de biosíntesis de alginato, 2 secuencias del gen citocromo oxidasa I (COX I) para el género *Macrocystis* y 4 secuencias del gen citocromo oxidasa II (COX II) para el género *Sargassum* (Tabla 3.2), a partir de la base de datos del Centro Nacional de información Biotecnológica - NCBI, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), la búsqueda se restringió solo a algas pertenecientes a la división Phaeophyta, y genes implicados en la biosíntesis de alginato.

### ➤ Alineamiento de secuencias

El análisis de alineamiento de secuencias, se llevó a cabo en el software Clustal Omega - ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) perteneciente a los servicios online del European Molecular Biology Laboratory, se seleccionaron 7 secuencias de las 24 encontradas de biosíntesis de alginato; 2 secuencias correspondientes al gen “algC”, 2 secuencias al gen “algD” y 3 secuencias pertenecientes al gen “algG”.

Se alineó las 4 secuencias del gen citocromo oxidasa II (COX II) para la identificación de *Sargassum sp.*, mientras que las secuencias del gen citocromo oxidasa I (COX I) por ser específicas para *Macrocystis integrifolia* y *Macrocystis pyrifera* no fue necesario su alineamiento.

**Tabla 3.2.** Acciones de secuencias reportadas en El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)

Nº	Gen	Alga reportada	Accesión
----	-----	----------------	----------



1	algC	<i>S. japonica</i>	<a href="#">KP772272.1</a>
2		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0195_0002</a>
3		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0000_0207</a>
4		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0120_0009</a>
5		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0120_0010</a>
6		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0120_0005</a>
7	algD	<i>S. japonica</i>	<a href="#">KY296309.1</a>
8		<i>S. japonica</i>	<a href="#">KP172530.1</a>
9		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0051_0092</a>
10		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0051_0013</a>
11		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0101_0043</a>
12		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0164_0053</a>
13	algG	<i>S. japonica</i>	<a href="#">AB299380.1</a>
14		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">LC053765.1</a>
15		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0882_0001</a>
16		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0069_0059</a>
17		<i>E. siliculosus</i>	<a href="#">Esi0010_0210</a>
18		<i>L. digitata</i>	<a href="#">FOMH-2018175</a>
19		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496449.1</a>
20		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496450.1</a>
21		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496451.1</a>
22		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496452.1</a>
23		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496453.1</a>
24		<i>L. digitata</i>	<a href="#">AJ496454.1</a>
25	COX I	<i>M. pyrifera</i>	<a href="#">KJ960271.1</a>
26		<i>M. integrifolia</i>	<a href="#">FJ409174.1</a>
27	COX II	<i>S. muticum</i>	<a href="#">HQ990492.1</a>
28		<i>S. ilicifolium</i>	<a href="#">MG893225.1</a>
29		<i>S. horneri</i>	<a href="#">KC782896.1</a>
30		<i>S. confusum</i>	<a href="#">KC782874.1</a>

#### 3.4.2.1.2. Diseño de cebadores: Tecnología integrada de ADN - IDT

Identificadas las zonas con menor variabilidad interespecífica o dicho de otra forma zonas de mayor homología (zonas consenso) de los 3 grupos de alineamientos múltiples (algC, algD y algG), se diseñaron los posibles cebadores en sentido directo “forward” (Fw) y en sentido inverso “reverse” (Rv).

Diseñados los oligos candidatos en la página Web IDT Tecnologías Integradas de DNA por sus siglas en inglés (Integrated DNA Technologies) (<https://www.idtdna.com/pages>), se analizaron con el programa Oligo Analyzer 3.1. (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), desarrollado por el Centro de Innovación Tecnológica de la Universidad de Iowa, se eligió los cebadores que presentaron mejores características (baja diferencia de temperatura de fusión e hibridación, que no formen dímeros de cebador, un porcentaje de Guanina-Citosina cercano al 60%, además de la presencia de 3 bases GC en la zona de anclaje 5' (Tabla 3.3.).

**Tabla 3.3.** Cebadores diseñados de biosíntesis de alginato.

N°	Gen	Código	Primer (5' -> 3')	bp	Tm (°C)	T. A.
1	algC	M-algC	Fw. 5' - AGTTACCAGAGGCTATGGCA -3' Rv. 5' - TTGGAGGTTGTCGAGTCCGT - 3'	20 20	61 60	211
2	algD	M-algD	Fw. 5' - ACAACTACGCGAACGGGCTG - 3' Rv. 5' - AGTTAGGGCTCTCGTCAAGCT - 3'	20 21	61 60	324
3	algG	M-algG	Fw. 5' - ACATCTACGACTCGGACATC - 3' Rv. 5' - GCTGCTTCTGTGCAGGAATA - 3'	20 20	61 62	478
4	Cox I	Mi-Cox	Fw. 5' - CGTGCAGGGAACCTCTACTTATG - 3' Rv. 5' - GTAGAACCACATCGTCACCTAAA - 3'	22 23	61 60	319
5		Mp-Cox	Fw. 5' - GTATTCAATCCGGTGCGACA - 3' Rv. 5' - CTTCAACGAAGTCAGGTGTATCT - 3'	20 23	61 61	304
6	COX II	S_COX2	Fw. 5' - CAAAGATGGATTTCGACGGTTGG - 3' Rv. 5' - CCGGTATCAAACCTCGCCCTT - 3'	22 20	60 60	350

\*bp: Pares de bases; Tm: Temperatura de melting o fusión; Ta: Tamaño de amplicon.

#### 3.4.2.1.3. Amplificación de cebadores en PCR in silico.

Seleccionadas las parejas de cebadores, se verificó su amplificación mediante PCR in silico usando el software Primer3 plus, los tamaños de productos de PCR para los genes *algC*, *algD* y *algG* se muestran en la Tabla 3.3.

Los cebadores diseñados fueron sintetizados en Macrogen Seúl en Corea del Sur y retornados al Laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez-Correa” (LMB-MGC) de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

#### **3.4.2.2. Estandarización del método de extracción CTAB de Doyle&Doyle 1990.**

Se estandarizó el método de extracción CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio) descrito por Doyle&Doyle 1990 (Ver anexo 5 y 6) (Rat et al., 2014). A continuación se describe el procedimiento estandarizado:

Se pesó 20 mg de tejido algal, se colocó en un mortero de porcelana, se molió el tejido de la fronda con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo muy fino. Se transfirió la muestra a tubos de 1.5ml.

- El tejido algal, se colocó en un mortero de porcelana, se molió el tejido de la fronda con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo muy fino. Se transfirió la muestra a tubos de 1.5ml.
- Se añadió tampón de extracción 700ml de CTAB 2% con PVP y  $\beta$ -mercaptoetanol precalentado (65°C) a cada muestra, el periodo de incubación se modificó de 45min a 2 h a una temperatura de 65°C, se mezcló por inversión (agitación vertical lenta) de 3 a 5 veces.
- Se adicionó un volumen de 700  $\mu$ l de “SEVAG” fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24:1) en la mezcla, y se centrifugó a 13 500 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo tres capas: superior, fase acuosa; la parte media, materia orgánica y proteínas; la fase inferior, cloroformo.
- Se colectó el sobrenadante (fase acuosa), aproximadamente 450  $\mu$ l en tubos *eppendorf* de 1.5ml previamente rotulados.

- Se añadió tampón de extracción 100ml de CTAB 10% precalentado (65°C) a cada muestra, el periodo de incubación se modificó de 15min a 1 h a una temperatura de 65°C, se mezcló por inversión (agitación vertical lenta) de 3 a 5 veces.
- Posteriormente se añadió 0,5 µl de RNasa A, a la solución de ADN; se incubó a 37 °C durante 30 min.
- Bajo campana, se adicionó por segunda vez 700 µl de “SEVAG” cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se mezcló por inversión, los tubos fueron centrifugados durante 10 min a 13500 rpm.
- Se colectó el sobrenadante aproximadamente 250 µl en tubos *eppendorf* de 1.5 ml rotulados.
- Para precipitar el ADN se agregó a tres muestras 600 µl de etanol frio (grado molecular), así mismo se agregó a otras tres muestras 600 µl de isopropanol frio, cada muestra se mezcló por inversión y se incubó a una temperatura de -20°C durante dos horas.
- Se centrifugó a 13500 rpm por 20 min por pipeteo se descartó el sobrenadante y se observó el *pellet*; Se adicionó 700µl de etanol al 70%, se mezcló y centrifugó a 13500 rpm por 1 min, se eliminó el sobrenadante teniendo en cuenta de no descartar el pellet.
- Se añadió 700µl de etanol al 70% frío, se mezcló por inversión centrifugando por 1 min a velocidad máxima (14000 rpm).
- Finalmente los residuos de etanol se extrajeron usando concentrador al vacío (*Concentrator plus*), el obtenido pellet se resuspendió en 30 µl de agua ultrapura.

### **3.4.3. Cuantificación y estimación de la pureza del ADN.**

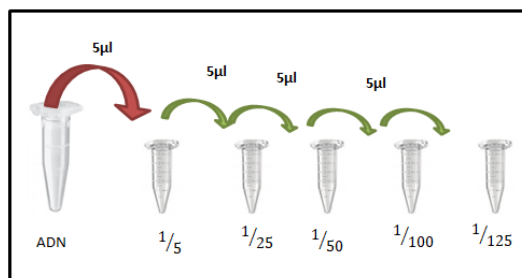
La cuantificación del material genético y los parámetros de calidad del ADN (para verificar contaminación por proteínas, etanol, sales, etc) se obtuvieron por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 Thermo Scientific, se tomó 1µl de muestra para las lecturas de cantidad y calidad del ADN.

#### 3.4.4. Visualización de la integridad del ADN.

Se observó la integridad del ADN mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 1% , con solución amortiguadora de Tris-Acido acético-EDTA (TAE 1X) (Anexo 7 y 8) (Espinosa, 2007). Posteriormente para visualizar el ADN se tiño con Gel Red a una concentración final de 30X (Uribe, Herrera, Orozco, & Betancur, 2013). La corrida de los ácidos nucleicos se realizó a 50 V durante 30 min., en un transiluminador de luz (Marca MAESTROGEN) con luz UV a 302 nm., los resultados se fotografiaron con una cámara digital, para su posterior interpretación. La integridad del ADN extraído se determinó por apreciación visual (Monroy-Vaca et al., 2014). Se usó marcador de peso lambda *hindIII*.

#### 3.4.5. Diluciones sucesivas de *Macrocystis pirifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador).

El ADN genómico extraído se diluyó por el método de diluciones sucesivas 1/5, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/125 tal y como se detalla en la Figura 3.4



**Figura 3.1.** Diluciones sucesivas 1/5, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/125, con volumen final de 25 µl.

#### 3.4.6. Amplificación de marcadores Citocromo Oxidasa I (COX I) y Citocromo Oxidasa II (COXII).

La viabilidad de la PCR se realizó utilizando diluciones 1/5, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/125 de las cuatro muestras de algas *Macrocyistis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocyistis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador). Los cebadores utilizados corresponden a marcadores filogenéticos Citocromo Oxidasa I (COX I) empleado en *Macrocyistis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocyistis integrifolia* (Perú) y Citocromo Oxidasa II (COXII) empleado en *Sargassum sp.* (Ecuador).

Se observó los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% , con solución amortiguadora de Tris-Acido acético-EDTA (TAE 1X), se usó marcador de peso O'GeneRuler 50bp DNA Ladder.

#### **3.4.7. Amplificación de cebadores algC, algD y algG específicos de biosíntesis de alginato.**

Se utilizó 1ul de ADN de las cuatro muestras de algas *Macrocyistis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocyistis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador), utilizando los cebadores algC, algD y algG (específicos en la biosíntesis de alginato)

La reacción de amplificación se desarrolló en un termociclador Mastercycler® Personal (Eppendorf) con las condiciones expresadas en la Tabla 3.4., teniendo en cuenta una reacción de 50ul volumen final, usando como amortiguador KAPA Taq 1X (Tabla 3.5).

Se observó los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% , con solución amortiguadora de Tris-Acido acético-EDTA (TAE 1X), se usó marcador de peso O'GeneRuler 50bp DNA Ladder.

**Tabla 3.4.** Proceso de amplificación de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Proceso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min.	
Desnaturalización	95 °C	30 seg.	
Alineamiento	60 °C	30 seg.	35 X
Extensión	72 °C	30 seg.	
Extensión final	72 °C	5 min.	

**Tabla 3.5.** Mezcla de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Reactivo	50 µl reacción	Concentración final
PCR-agua de calidad	Hasta 50 µL	
10X KAPA Taq Buffer	5.0 µL	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	Según sea necesario	≥1.5 mM
10 mM dNTP Mix	1 µL	0.2 mM
10 µM Reverse Primer	1.0 µL	0.2 µM
5 U/µL KAPA Taq DNA	0.2 µL	1 U
ADN Molde	Según sea necesario	Según sea necesario

### 3.4.8. Secuenciamiento de productos de PCR

Los productos de PCR fueron enviados con un volumen final de 50µl, siendo transferidos a microtubos de 1.5µl marca Axigen, rotulados y sellados con parafilm, así mismo se transfirió 10 µl de los cebadores algC, algD y algG de ambas direcciones forward (Fw) y reverse (Rv) a microtubos de 0.6ml de capacidad total (Camacho, Mattio, Draisma, Fredericq, & Diaz-Pulido, 2015).

### 3.4.9. Análisis bioinformáticos

Las secuencias obtenidas de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.*, fueron editadas con el programa BIOEDIT (Salavarría, 2014), e ingresadas al NCBI para obtener el porcentaje de similitud con las secuencias almacenadas en dicho banco de genes, finalmente se realizó alineamientos múltiples con las nuevas secuencias y con las secuencias ya reportadas de *Ectocarpus siliculosus*, *Saccharina japonica* y *Laminaria digitata* obtenidas del banco de genes.

#### **3.4.10. Extracción de alginato**

Se realizó la extracción de alginato, a partir de biomasa 5gr. de biomasa s de las tres especies de algas pardas: *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y (Figura 3.6) *Sargassum sp.*; se modificó el protocolo de Camacho & Hernández-Carmona 2012 (Ver anexo 9 y 10).

- Las muestras de algas para la extracción de alginatos se secó en horno, (temperatura aproximada de 40–50°C) hasta obtener un peso constante.
- El material seco de cada especie, se mezcló previo a la extracción, se analizaron por separado tres réplicas de *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y una réplica de *Sargassum sp.*
- Para la extracción del alginato, se rehidrataron 5 g de alga seca durante una noche con 180 mL de agua destilada y 0.18 mL de formaldehído.
- La solución se filtró y el líquido fue descartado.
- Las algas fueron tratadas con 50 mL de solución de HCl a pH 4 durante 15 min y con agitación constante.
- La solución se filtró y el líquido fue descartado.

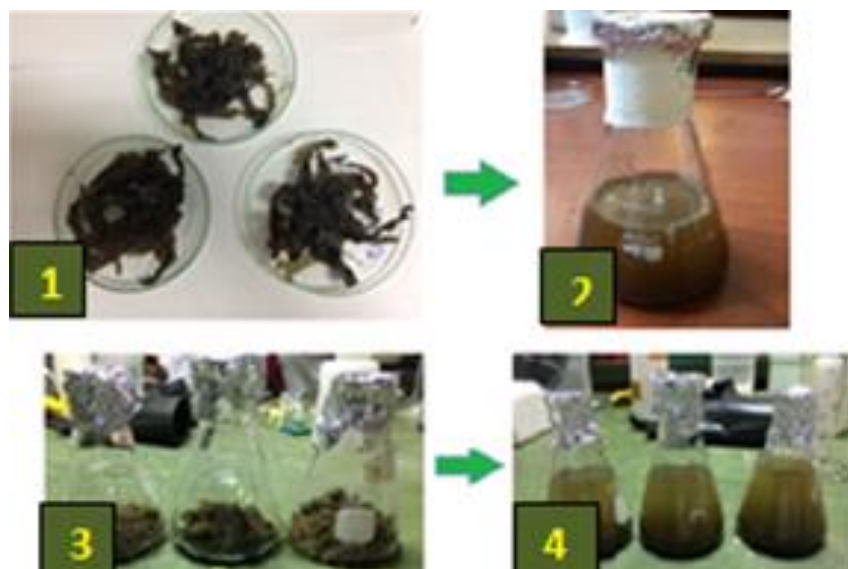


- Después de la filtración, las algas fueron tratadas con 50 mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 10, se incubó a 80 °C durante 2 h en baño María, con agitación constante.
- El alginato extraído se filtró al vacío para separar el alga residual (principalmente celulosa), y el alginato en solución se precipitó con un volumen igual de etanol, agitando lentamente con una varilla de vidrio.
- Las fibras precipitadas de alginato se enrollaron a la varilla. Las fibras se removieron, se desenredaron, se lavaron con alcohol.
- Se eliminó los residuos de etanol, presentes en las fibras de alginato utilizando el desecador durante 3h a 45 °C.

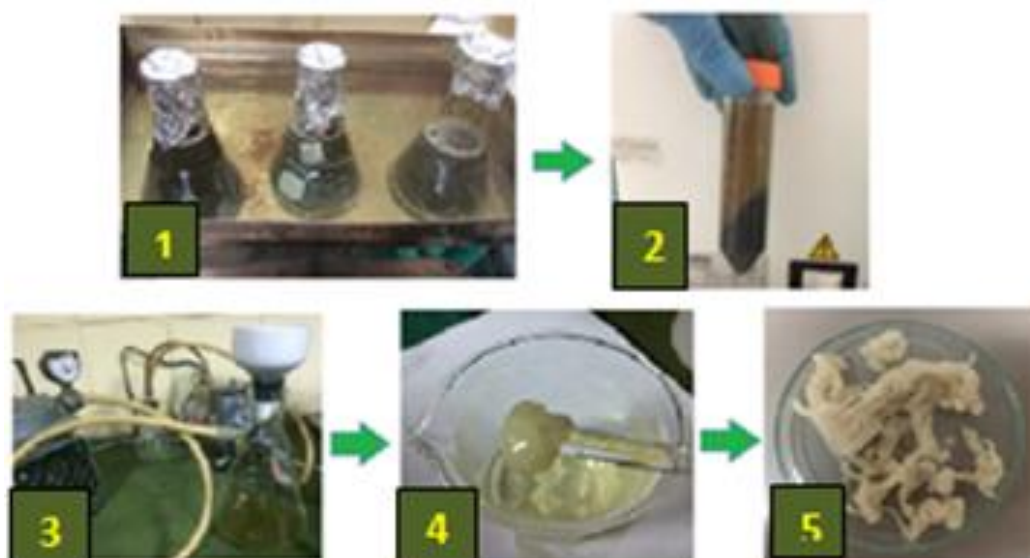
#### **3.4.11. Cálculo del rendimiento (R)**

Se determinó el rendimiento empleando la siguiente relación (Monroy-Vaca et al., 2014):

$$R = \frac{\text{Biomasa inicial (mg)}}{\text{Biomasa final (mg)}} \times 100$$



Pre-Extracción ácida, las frondas son trituradas e hidratadas en formaldehído, la solución es filtrada y se agrega HCl a pH 4 en agitación constante durante 15min, para filtrar la solución.



Pre-Extracción básica, al filtrado se le agrega una solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 10, la solución es filtrada al vacío, el alginato es precipitado con etanol al 96%.

**Fig. 3.2.** Proceso de extracción del alginato de sodio.

### **3.5. Aspectos éticos.**

En la presente investigación se tomó todas las medidas para el cuidado y conservación de las algas *Macrocystis integrifolia* y *Macrocystis pyrifera*, solicitando a la Municipalidad de San Juan de Marcona los permisos correspondientes para el ingreso a las zonas de muestreo.

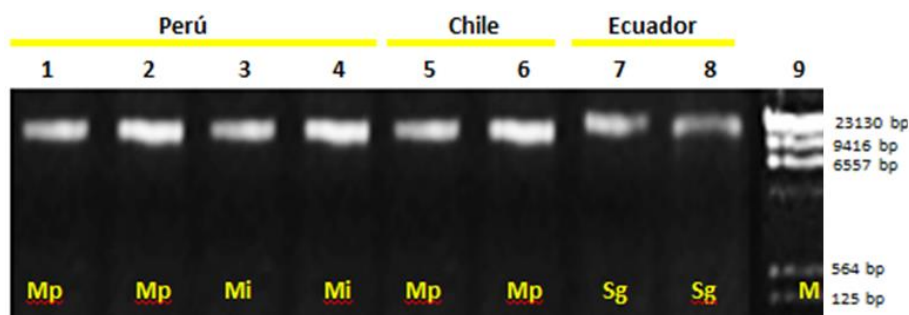
## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Resultados.

#### 4.1.1. Extracción de ADN de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador)

Los datos de cantidad e integridad del ADN genómico extraído de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador) han sido leídos en Nanodrop 2000 Thermo Scientific (tabla 4.1.) y corroborados mediante electroforesis en gel 1% de agarosa (figura 4.1), usando como marcador de peso Lambda ADN/Hind III.

El ADN de *Macrocystis pyrifera* (Perú), *Macrocystis integrifolia* (Perú), *Macrocystis pyrifera* (Chile) y *Sargassum sp.* (Ecuador) presenta concentraciones promedio de 376.9, 375.8, 363.8 y 264.6ng/μl respectivamente, de tal forma los parámetros de calidad  $A_{260/280}$  registra valores 1.8, 1.8, 1.83 y 1.73 y  $A_{260/230}$  registra valores promedio y 1.8, 1.77, 1.79 y 1.76 para *Macrocystis pyrifera* (Perú), *Macrocystis integrifolia* (Perú), *Macrocystis pyrifera* (Chile) y *Sargassum sp.* (Ecuador) respectivamente.



**Figura 4.1.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra ADN genómico extraído, *Macrocystis pyrifera* (Perú) (Carril N° 1 y 2); *Macrocystis integrifolia* (Perú) (Carril N° 3 y 4); *Macrocystis pyrifera* (Chile) /Carril N° 5 y 6); y *Sargassum sp.* (Ecuador) (Carril N° 7 y 8); Marcador (Carril N°9)

**Tabla 4.1.** Datos del ADN genómico extraído de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador).

N°	Pais de Procedencia	Especie	Concentración ng/μl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	Perú	<i>M. pyrifera</i>	374.9	1.81	1.80
2	Perú	<i>M. pyrifera</i>	379.0	1.80	1.80
3	Perú	<i>M. integrifolia</i>	388.2	1.80	1.77
4	Perú	<i>M. integrifolia</i>	363.4	1.81	1.78
5	Chile	<i>M. pyrifera</i>	367.7	1.82	1.79
6	Chile	<i>M. pyrifera</i>	360.0	1.84	1.79
7	Ecuador	<i>Sargassum sp.</i>	267.9	1.74	1.76
8	Ecuador	<i>Sargassum sp.</i>	261.4	1.73	1.76

#### 4.1.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

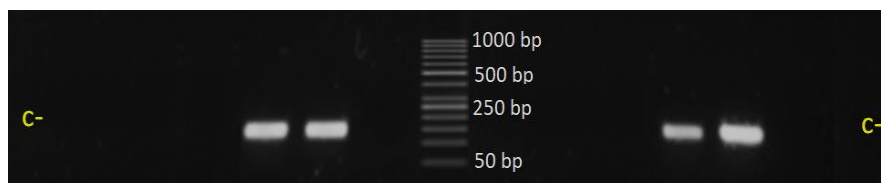
##### 4.1.2.1. Amplificación de marcadores Citocromo Oxidasa I (COX I) y Citocromo Oxidasa II (COXII).

La viabilidad de la PCR se vio reflejada utilizando diluciones sucesivas:  $1/5$ ,  $1/25$ ,  $1/50$ ,  $1/100$  y  $1/125$  y al utilizar los cebadores de Citocromo Oxidasa I (COX I) de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y Citocromo Oxidasa II (COX II) fue utilizado para *Sargassum sp.*

En las cuatro muestras de algas *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador), se demuestra la obtención de productos de PCR en las diluciones  $1/50$  y  $1/100$  usando 1μl de dilución para la PCR, estos resultados son verificados mediante electroforesis en gel 1% de agarosa (figuras 4.2., 4.3. y 4.4.). El marcador de peso usado fue O'GeneRuler 50bp DNA Ladder.

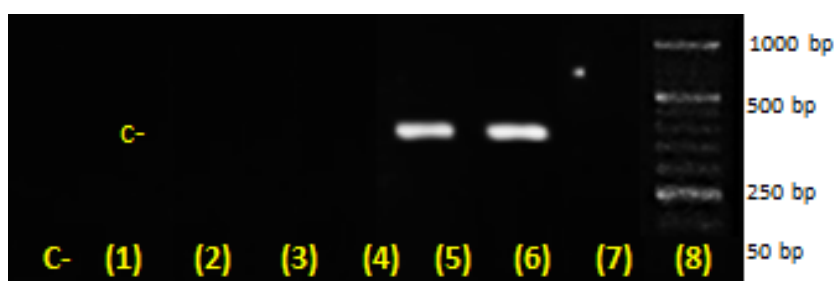
#### ➤ Perú: San Juan de Marcona





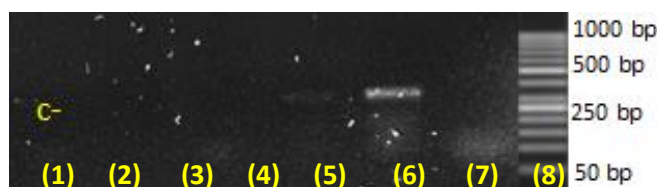
**Figura 4.2.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra ADN genómico extraído, *Macrocystis pyrifera* (Perú) (Carril N° 1-7); *Macrocystis integrifolia* (Perú) (Carril N° 9-15); Muestra sin diluir (Carril 2 y 9); diluciones:  $\frac{1}{5}$  (Carril 3 y 10),  $\frac{1}{25}$  (Carril 4 y 11),  $\frac{1}{50}$  (Carril 5 y 12),  $\frac{1}{100}$  (Carril 6 y 13),  $\frac{1}{125}$  (Carril 7 y 14); Control negativo (Carril 1 y 15); Marcador 50bp (Carril 8)

➤ **Chile: Región Bío Bío**



**Figura 4.3.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *M. pyrifera* (Chile), Muestra sin diluir (Carril 2); diluciones:  $\frac{1}{5}$  (Carril 3),  $\frac{1}{25}$  (Carril 4),  $\frac{1}{50}$  (Carril 5),  $\frac{1}{100}$  (Carril 6),  $\frac{1}{125}$  (Carril ); Control negativo (Carril 1); Marcador 50bp (Carril 8).

➤ **Ecuador: Santa Elena**

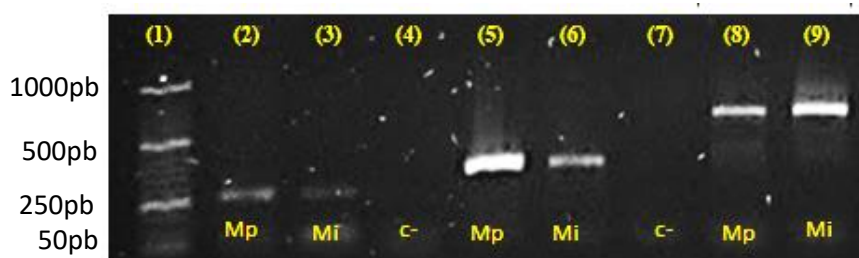


**Figura 4.4.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Sargassum sp.* (Ecuador); Muestra sin diluir (Carril 2); diluciones:  $\frac{1}{5}$  (Carril 3),  $\frac{1}{25}$  (Carril 4),  $\frac{1}{50}$  (Carril 5),  $\frac{1}{100}$  (Carril 6),  $\frac{1}{125}$  (Carril ); Control negativo (Carril 1); Marcador 50bp (Carril 8).

**4.1.3. Genes de biosíntesis de alginato: *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile), *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador).**

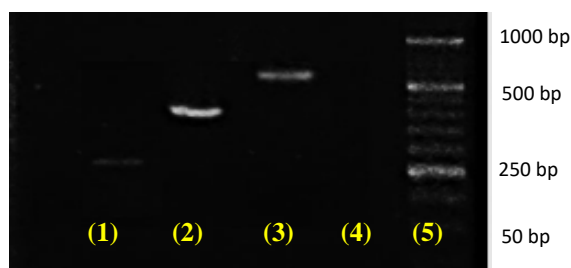
Al determinar que las diluciones óptimas para obtener productos de PCR en *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú) son de  $1/50$  y  $1/100$ , mientras que en *Sargassum sp.* (Ecuador) la dilución optima es de  $1/100$ ; Se lograron identificar los genes algC, algD y algG implicados en la biosíntesis de alginato en las algas pardas *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú); Con respecto al alga parda *Sargassum sp.* (Ecuador) no se lograron obtener producto de PCR. Estos resultados son verificados mediante electroforesis en gel 1% de agarosa (Figura 4.5., 4.6. y 4.7.). Se usó marcador de peso O'GeneRuler 50bp DNA Ladder.

➤ **Perú: San Juan de Marcona**



**Figura 4.5.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Macrocystis pyrifera* (Mp) y *Macrocystis integrifolia* (Mi) (Perú): algC (Carril 2 y 3), algD (Carril 5 y 6) y algG (Carril 8 y 9); Control negativo (C-) (Carril 4 y 7); Marcador 50bp (Carril 1).

➤ **Chile: Región Bío Bío: *Macrocystis pyrifera***



**Figura 4.6.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Macrocystis pyrifera* (Chile): algC (Carril 1), algD (Carril 2) y algG (Carril 3); Control negativo (Carril 4); Marcador 50bp (Carril 5).

➤ **Ecuador Santa Elena: *Sargassum sp.***



**Figura 4.7.** Electroforesis en gel 1% de agarosa, muestra los resultados de PCR de *Sargassum sp.* (Ecuador), no se obtuvo producto de PCR (Carril 1-4); Marcador 50bp (Carril 5).

#### 4.1.4. Análisis bioinformáticos

Al analizar los resultados provenientes de Macrogen corea del sur, de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú) mediante el Software BIOEDIT, ingresaron y editaron las secuencias forward (Fw) y reverse (Rv) de cada gen, esta edición proporciono las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de alginatos con tamaños específicos para cada gen algC, algD y algG, los cuales se encuentran registrados en la tabla 4.5.

Las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de alginato almacenados en NCBI fueron usadas para crear alineamientos múltiples en ClustalW Multiple alignment de BIOEDIT con las secuencias obtenidas de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú), al comparar dichas secuencias se obtuvieron diferentes zonas consenso (Figura 4.8., 4.9. y 4.10.).

De las 9 secuencias obtenidas, cuyos resultados en la búsqueda con BLASTN (NCBI) con Valor E inferior a 0,05 corresponden en cada caso a los genes para las cuales fueron diseñados, el porcentaje de identidad de cada secuencia y el nombre científico del alga parda homóloga reportado en el NCBI, se registran en la tabla 4.6.

**Tabla 4.2.** Tamaño del producto de genes de biosíntesis de alginato en de *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú).



N°	País	Especie	Gen	Tamaño de Amplicón
1	PERÚ	<i>M. pyrifera</i>	algC	213 bp
2			algD	459 bp
3			algG	552 bp
4		<i>M. integrifolia</i>	algC	214 bp
5			algD	445 bp
6			algG	550 bp
7	CHILE	<i>M. pyrifera</i>	algC	213 bp
8			algD	451 bp
9			algG	550 bp

**Tabla 4.3.** Porcentaje de identidad de las secuencias de genes de biosíntesis de alginato en *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) y *Macrocystis integrifolia* (Perú).

N°	País	Alga de Estudio	Gen	Alga NCBI	Proteína codificante	E-value	Ident.
1	Perú	<i>M. pyrifera</i>	<i>algC</i>	<i>S. japonica</i>	fosfomanomutasa	2e-75	93%
2			<i>AlgD</i>	<i>S. japonica</i>	GDP-manosa 6-deshidrogenasa	8e-153	96%
3			<i>algG</i>	<i>S. japonica</i>	manuronano C-5 epimerasa	2e-43	89%
4		<i>M. integrifolia</i>	<i>algC</i>	<i>S. japonica</i>	fosfomanomutasa	5e-72	90%
5			<i>algD</i>	<i>S. japonica</i>	GDP-manosa 6-deshidrogenasa	3e-150	96%
6			<i>algG</i>	<i>S. japonica</i>	manuronano C-5 epimerasa	1e-31	86%
7				<i>L. digitata</i>		3e-18	88%
8	Chile	<i>M. pyrifera</i>	<i>algC</i>	<i>S. japonica</i>	fosfomanomutasa	3e-77	93%
9			<i>algD</i>	<i>S. japonica</i>	GDP-manosa 6-deshidrogenasa	5e-41	96%
10			<i>algG</i>	<i>S. japonica</i>	manuronano C-5 epimerasa	1e-38	87%

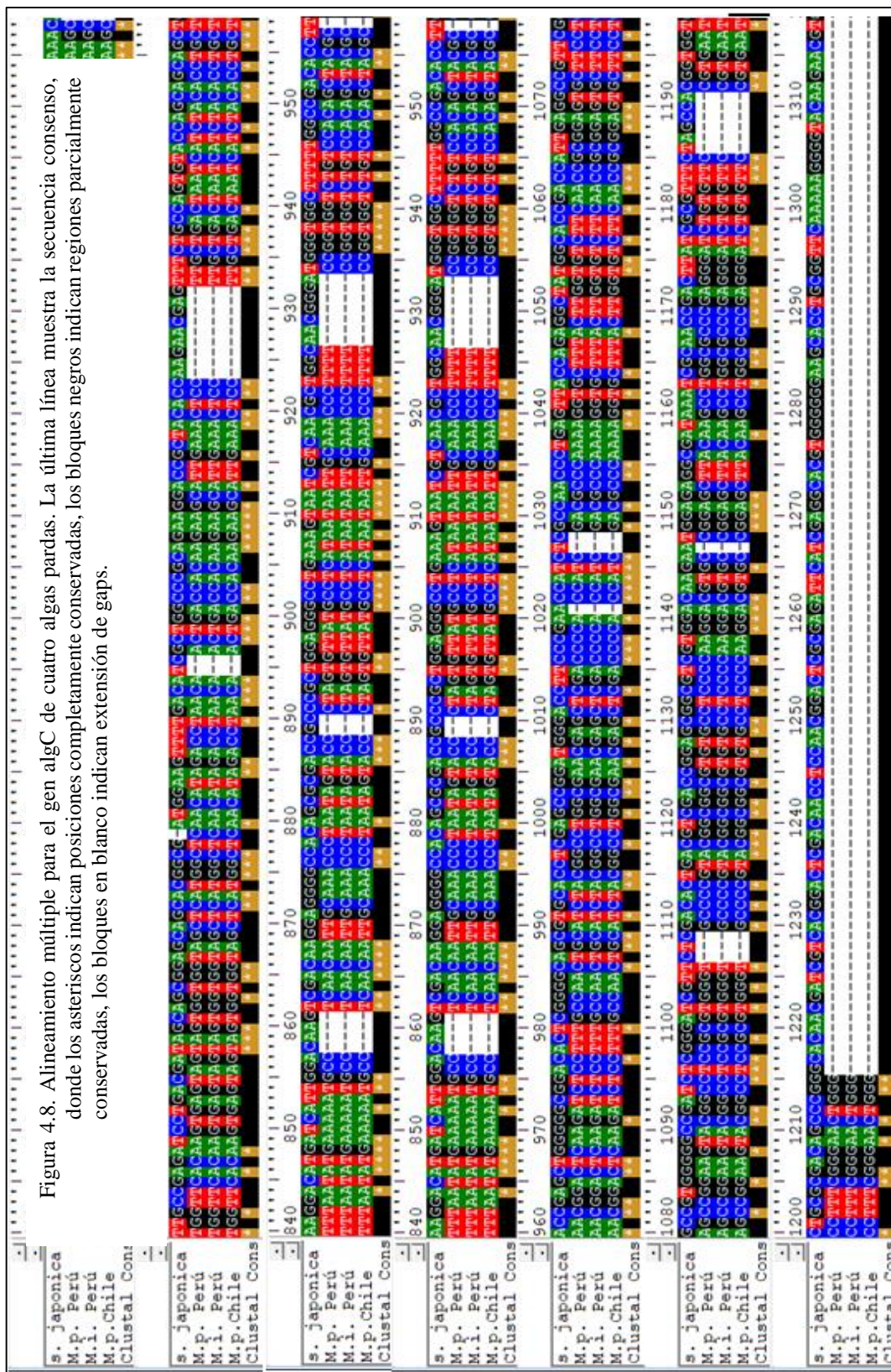
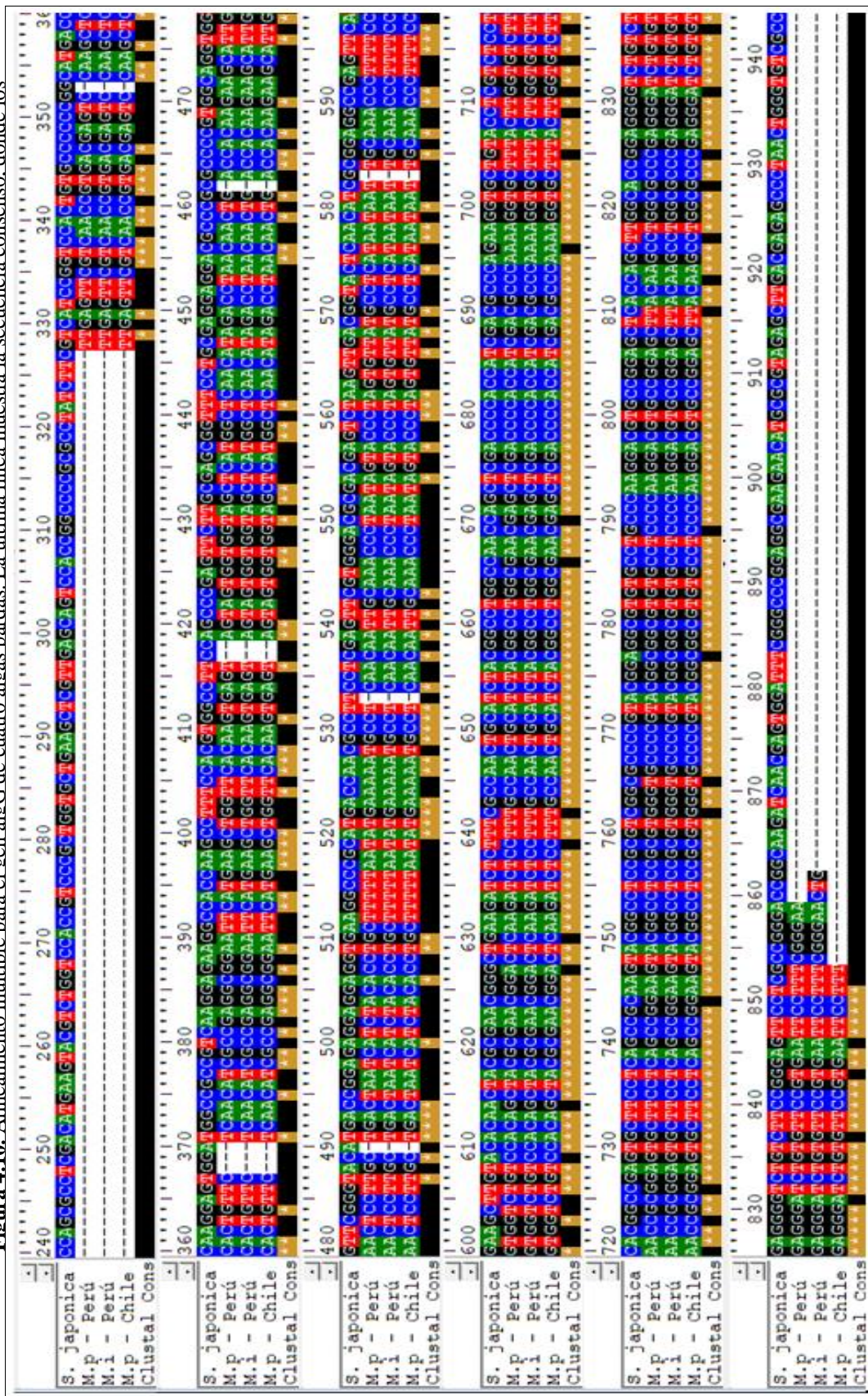


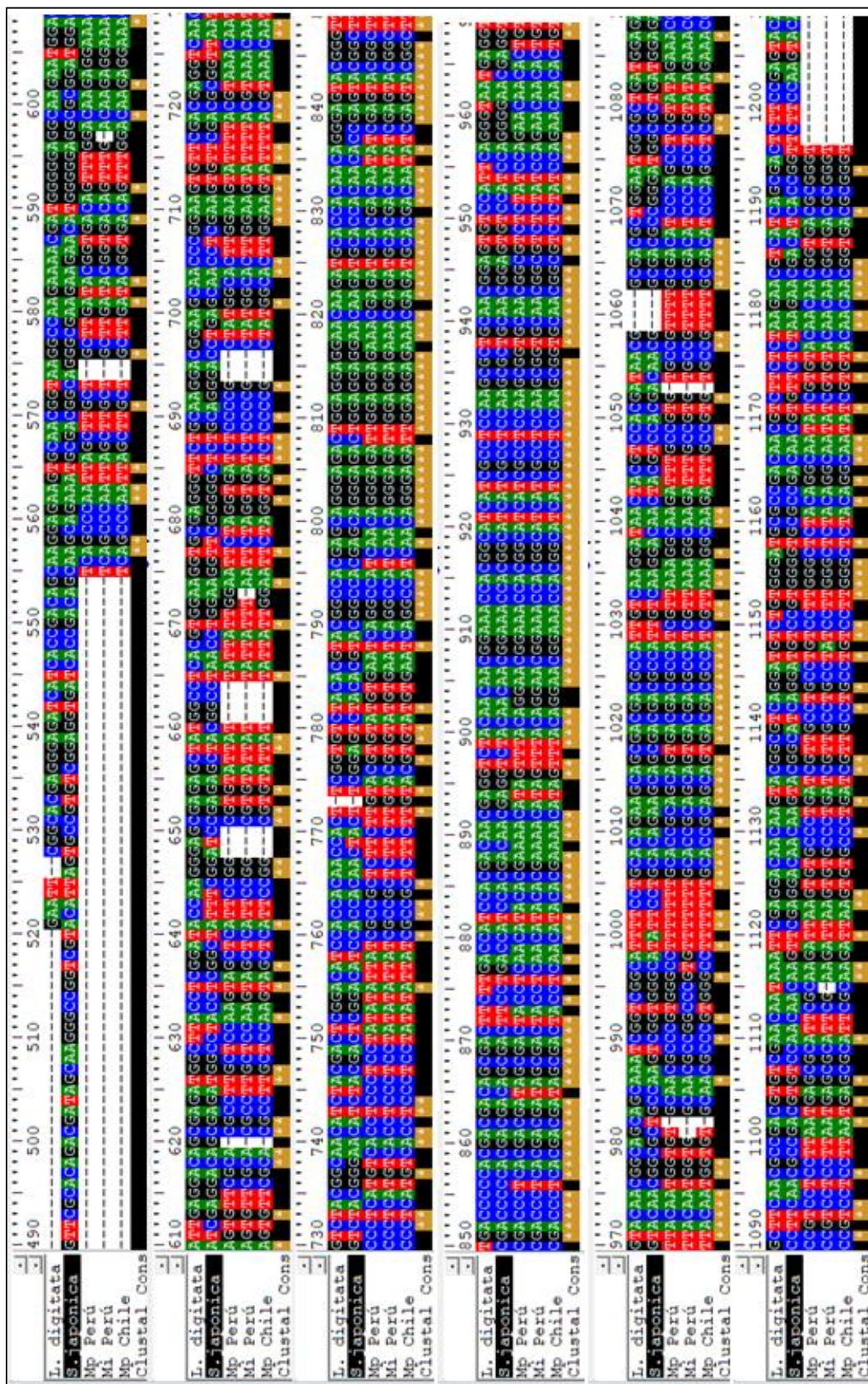


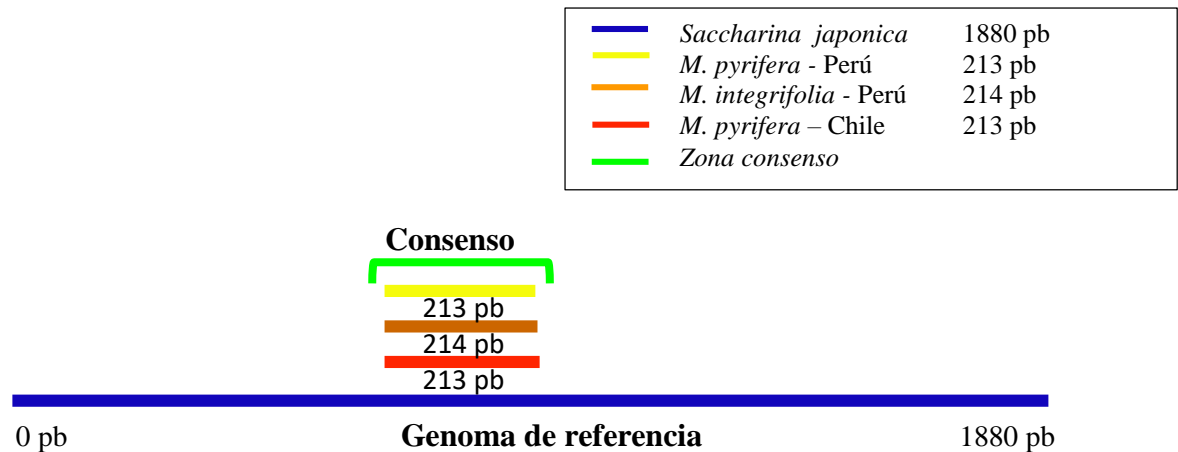


Figura 4.10. Alineamiento múltiple para el gen *alsG* de cuatro algas pardas. La última línea muestra la secuencia consenso, donde los

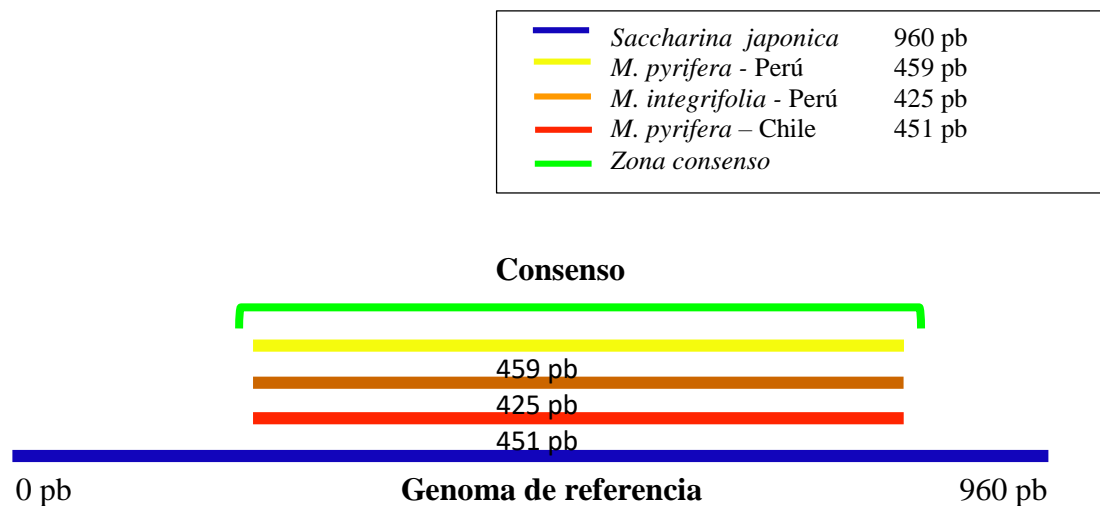




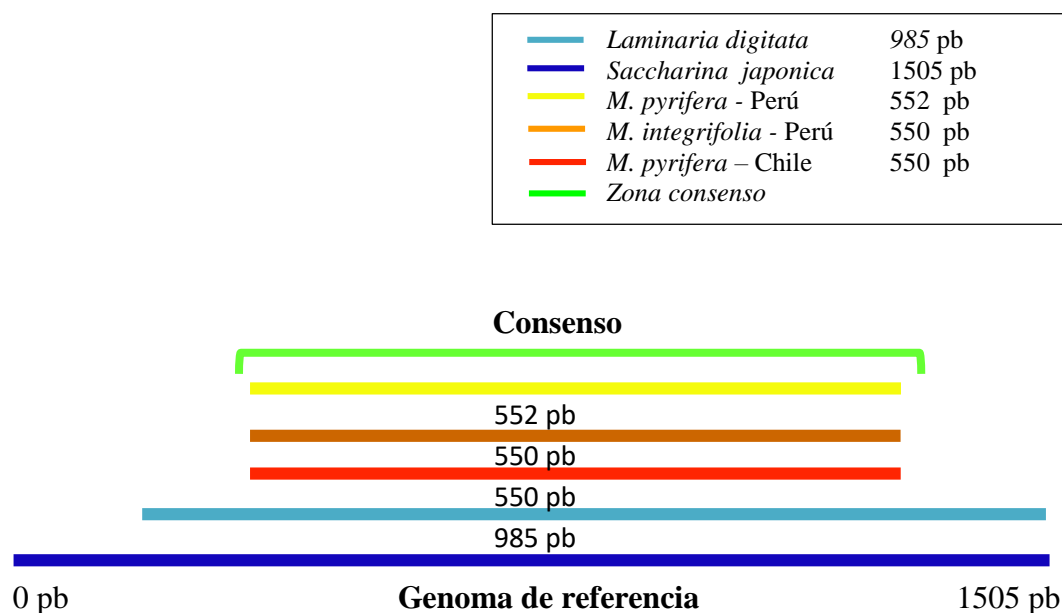




**Figura 4.11.** Gráfico alineamiento múltiple del gen *algC*. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen *algC* de *Saccharina japonica* con un total de 1880 pares de bases (pb), las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 213, 214 y 213 pares de bases (pb) respectivamente



**Figura 4.12.** Gráfico alineamiento múltiple de *algD*. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen *algD* de *Saccharina japonica*, con un total de 960 pares de bases (pb), las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 459, 425 y 451 pares de bases (pb) respectivamente



**Figura 4.13.** Gráfico alineamiento múltiple de algG. El genoma de referencia corresponde a la secuencia codificante completa (CDS, coding sequence) del gen algG de *Saccharina japonica*, con un total de 1505 pares de bases (pb) y la secuencia parcial de *Laminaria digitata* con 985 pb además de las secuencias parciales de *M. pyrifera*, *M. integrifolia* – Perú y *M. pyrifera* – Chile cuentan con un total de 552, 550 y 550 pares de bases (pb) respectivamente

#### 4.16. Extracción de alginato de sodio

Fenotípicamente se demuestra que *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador) sintetizan alginato de sodio, esto se logró demostrar al extraer alginato, con rendimientos promedio de 21.3% 33.3% y 18.8%, en *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp* respectivamente; De acuerdo con estos resultados, *Macrocystis integrifolia* (Perú) presenta el mayor rendimiento (tabla 4.7.).

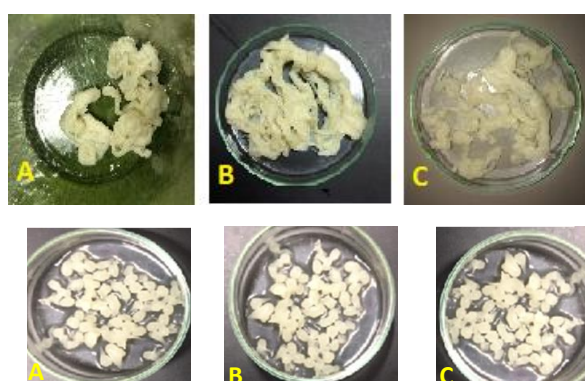
Se demuestra que la fibras obtenidas en el proceso de extracción es alginato de sodio ya que al hidratar dichas fibras con agua y obtener una solución acuosa, esta solución por el método de jeringa es expuesta a cloruro de sodio 0.5M y de forma inmediata esta gotas se gelifican (característica principal del alginato) (Figura 4.8.).



Se contó con un control positivo en la gelificación del alginato, al exponer alginato de sodio industrial de *Macrocystis pyrifera* en Cloruro de sodio 0.5M, donde se obtuvieron esferas transparentes con textura de gel, estas esferas se compararon con las obtenidas previamente en el proceso de extracción de alginato de *Macrocystis pyrifera* (Perú), donde se obtuvieron esferas blanquecinas con textura de gel (Figura 4.9.).

**Tabla 4.7.** Datos de la extracción alginato de sodio extraído de *Macrocystis pyrifera* (Perú) y *Macrocystis integrifolia* (Perú) *Sargassum sp.* (Ecuador).

N°	País	Especie	Rendimiento		
			biomasa inicial	Peso del alginato de sodio	% Rend. promedio
1	Perú	<i>M. pyrifera</i>	5 gr.	1.05 gr.	21.3%
2			5 gr.	1.08 gr.	
3			5 gr.	1.07 gr.	
4		<i>M. integrifolia</i>	5 gr.	1.54 gr.	33.3%
5			5 gr.	1.60 gr.	
6			5 gr.	1.81 gr.	
7	Ecuador	<i>Sargassum sp.</i>	4 gr.	0.62 gr.	18.8 %
8			4 gr.	0.65 gr.	
9			4 gr.	0.61 gr.	



**Figura 4.14.** Fibras de alginato de sodio de *Macrocystis pyrifera* (A), *Macrocystis integrifolia* (B) y *Sargassum sp.* (C); Esferas de alginato de sodio gelificadas con cloruro de sodio 0.5M





**Figura 4.15.** Esferas de alginato de sodio (Industrial) (A), esferas de alginato de sodio extraído en laboratorio (B), ambas gelificadas con cloruro de sodio 0.5M.

## 4.2. Discusión.

Los polisacáridos son contaminantes comunes en el ADN extraído de tejidos vegetales, son visualmente evidentes en extracciones de ADN por su textura viscosa como de goma y hacen al ADN no manejable en el pipeteo y no amplificable en el PCR debido a la inhibición de la Taq ADN polimerasa; las altas concentraciones de sales y la presencia de CTAB ayudan a la precipitación de los polisacáridos (Cerdeira-Granados & Díaz, 2013), Además el ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas moleculares (Sambrook et al. 1989). Mediante la estandarización del protocolo de Doyle & Doyle (1990), se obtuvo ADN con parámetros permisibles para realizar amplificaciones de PCR convencional (reacción en cadena de polimerasa).

La PCR es un método de biología molecular que permite amplificar el material genético de tal forma que una pequeña porción de ADN (3-6 ng/ul) es suficiente para detectar la presencia de cualquier organismo (Carroll, et al. 2000). A partir de diluciones seriadas se logró reducir la presencia de inhibidores en muestras de ADN, obteniendo como resultado amplificación de los marcadores citocromo oxidasa (COX I y COX II) en la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

El punto crítico del ensayo de PCR es la selección de un marcador genético apropiado y el diseño de cebadores que permitan su amplificación, en la elección de marcadores genéticos es importante considerar diversas premisas, es preferible utilizar regiones de ADN que codifiquen proteínas, ya que los errores en la amplificación o en la secuenciación pueden detectarse fácilmente, es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia se haya determinado previamente en diversos organismos, preferiblemente en otras especies (Programa del profesorado, 2000 y Alejos et al. 2015). Para poder observar la viabilidad de la PCR, además de realizar diluciones sucesivas, se utilizaron dos marcadores genéticos Citocromo Oxidasa I (COX I) utilizado para identificar a *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Perú) y Citocromo Oxidasa II (COX II) para identificar a *Sargassum* sp. De tal forma que los cebadores COX I fue diseñado a partir de una secuencia ya conocida de *Macrocystis pyrifera* (Mp\_COX I) y una secuencia ya conocida de *Macrocystis integrifolia* (Mi\_COX I), sin embargo para el diseño de COX II utilizado en *Sargassum* sp., se utilizaron secuencias conocidas de *Sargassum*

*muticum*, *S. ilicifolium*, *S. horneri* y *S. confusum*. Realizando un alineamiento múltiple e identificando la zona consenso para el diseño del cebador.

En la biosíntesis de alginato el paso de Fructosa-6-P a Manosa-1-P no es exclusivo del metabolismo de alginato, son comunes a todas las vías que utilizan manosa activada (por ejemplo, proteínas glicosilación). La enzima fosfomanomutasa (PMM), está involucrada en la biosíntesis de polisacáridos que contienen manosa, incluyendo alginato (Zhang et al., 2018). Las reacciones específicas para la biosíntesis de alginato son los pasos de conversión de GDP-manosa a la epimerización C5 final de la cadena de polimanuronano en ácido algínico, las algas pardas son esencialmente los únicos eucariotas que poseen alginato (Michel et al., 2010). Ya que *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.*, pertenecen a la división Phaeophyta (algas pardas), poseen los genes de biosíntesis de alginato, sin embargo solo se identificaron los genes algC, algD y algG en *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*. A partir de la secuencia parcial *Ectocarpus siliculosus* y la secuencia completa de *Saccharina japonica*, se lograron obtener nuevas secuencias para el gen algC en *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*.

El precursor del alginato en algas pardas es el ácido GDP-manurónico (GDP-ManA) (Tenhaken et al., 2011). Velázquez et al., s.f. indica que en *Azotobacter vinelandii* el gen algD codifica a GDP-Manosa deshidrogenasa (GMD), una enzima clave en la biosíntesis del alginato, de tal manera que en *Ectocarpus siliculosus* el gen algD existe como un gen multicopia, además en el transcriptoma de *Saccharina japonica* dos genes algD han sido aislados llevándose a cabo un análisis funcional, donde se espera arrojar luz sobre las estructuras de GMD y sus posibles roles en la adaptación de las algas pardas a las tensiones ambientales, para enriquecer aún más nuestra comprensión sobre la síntesis de alginato en algas pardas (Zhang et al., 2016). En el presente estudio a partir de las secuencias completas de *Ectocarpus siliculosus* y la secuencia parcial de *Saccharina japonica* se ha podido obtener una nueva secuencia para el gen algD a partir de las algas pardas *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia*.

La ruta biosintética del alginato en algas pardas, el paso final es la epimerización de los residuos d-manurónicos. en residuos l-gulurónicos dentro de la cadena del polímero, una reacción catalizada por manuronano C-5-epimerasa, dada su estructura química y función biológica proporciona fuerza y flexibilidad para el tejido de algas (Nyvall et al., 2003), además de ha demostrado que en *Laminaria digitata*, el último paso de la biosíntesis de alginato es catalizado por una gran familia de enzimas homólogas a MC5E (Michael et al., 2010) Los genes que fueron identificados para la biosíntesis de alginato y que codifican a las Manuronan-C5-epimerasa (MC5E) es el gen algG identificados en *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia*. Al no contar con secuencias completas para el gen algG no se logró obtener producto de PCR en *Sargassum* sp.

El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, entre múltiples secuencias biológicas, esto puede hacerse comparando las nuevas (desconocidas) con las bien estudiadas y anotadas (conocidas) secuencias, los científicos han encontrado que dos secuencias similares poseen el mismo papel funcional, la comparación se puede hacer desde aspectos de comportamiento bioquímico o de acuerdo a la estructura de la proteína. Si hay dos secuencias de diferentes organismos son similares, se dice que son *secuencias homólogas* (Phoebe, 2005), La comparación de la secuencia de ADN es el centro del análisis bioinformático, el alineamiento de pares de secuencias es fundamental en la búsqueda de similitudes dentro de la base de datos, cuando dos secuencias son descendientes de un origen evolutivo común, se dice que tienen una relación homóloga u homología (Meneses et al, 2011). Las secuencias de los genes algC, algD y algG de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia*, encontradas en el banco de genes NCBI comparten homología con las secuencias ya conocidas de *Saccharina japónica* y *Laminaria digitata*, donde poseen un porcentaje de identidad cercano al 90%.

BLAST es una herramienta que intenta optimizar una medida de similitud (Altschul, 1997), compara una secuencia problema (query sequence) de nucleótidos o de proteínas con todas las secuencias de una base de datos de nucleótidos o de proteínas, a partir de los resultados de una búsqueda con BLAST se pueden inferir relaciones funcionales, estructurales o evolutivas entre dos secuencias y, de este modo, identificar nuevos miembros de una familia de

genes o de proteínas. Además de encontrar secuencias idénticas o con similitud local, BLAST hace un alineamiento con la secuencia problema y calcula la significancia estadística de los resultados (Smith, 1981). En la investigación las secuencias problema (query sequence) fueron las secuencias obtenidas a partir de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia*, que fueron comparadas con secuencias ya conocidas en la base de datos de NCBI, mediante BLAST se obtuvieron resultados significativos, donde se logró identificar secuencias de los genes de biosíntesis de alginato algC, algD y algG de *Saccharina japónica* y *Laminaria* con un alto grado de similitud (aproximadamente 87-96% de identidad) con respecto las secuencias problema de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia*.

Los mecanismos de gelificación iónica se lleva a cabo fundamentalmente por dos procesos: El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ion calcio hacia la solución de alginato de pH neutro, la solución del gel se inicia con la interfaz y avanza hacia el interior (gelificación interna) a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ion sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua, este interacciona con los bloques G de diferentes moléculas poliméricas, entrelazándolas entre sí (Avendaño et al., 2013). Aunque la fuente de calcio más usada ha sido el  $CaCl_2$  debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, existen otras sales empleadas con menor frecuencia tales como el acetato monohidratado de calcio y el lactato de calcio (Helgerud et al., 2010). En la presente investigación se utiliza Cloruro de calcio 0.5M para gelificar la solución de alginato 1%.

El alginato de sodio precipita en forma de perlas en soluciones acuosas de cationes multivalentes ( $Ca^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ ), el proceso de gelificación es considerablemente rápido. Al instante en que se agrega la gota de alginato de sodio a la solución de calcio, los cationes  $Ca^{2+}$  rápidamente entrecruzan las cadenas poliméricas en la superficie de la perla, fijando así su forma esférica. Al principio, las perlas son transparentes, pero a medida que transcurre el tiempo se van tornando más opacas (Ayarza, 2015). Al exponer el alginato de sodio en cloruro de sodio mediante el método de jeringa se formaron perlas de alginato de color transparente en el alginato de sodio industrial, mientras que el alginato extraído en laboratorio, las perlas obtenidas fueron de color blanquecino.

## V. CONCLUSIONES

- Mediante PCR convencional se pudo identificar los genes algC, algD y algG en *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) *Macrocystis integrifolia* (Perú), en *Sargassum sp.* no se obtuvo producto de PCR.
- Los cebadores algC, algD y algG fueron diseñados cumpliendo con todos los parámetros que influyen en la amplificación de PCR, de modo que su uso fue factible para la obtención de productos de PCR.
- Al estandarizar el protocolo de Doyle&Doyle 1990, se logró extraer ADN genómico en *Macrocystis pyrifera* (Perú y Chile) *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* (Ecuador), el ADN fue utilizado para la obtención de productos de PCR.
- Los análisis informáticos indican que las secuencias obtenidas corresponden a los genes algC, algD y algG implicados en la biosíntesis de alginato, teniendo un porcentaje de similitud elevado en secuencias de algas pardas ya reportadas para la biosíntesis de alginato en el banco de genes NCBI.
- Al extraer alginato de sodio de las tres algas *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* (Perú) y *Sargassum sp.* se demuestra fenotípicamente que las tres algas sintetizan este compuesto, sin embargo genéticamente no se logró identificar los genes algC, algD y algC implicados en la biosíntesis de alginato en el alga parda *Sargassum sp.*

## VI. RECOMENDACIONES

- Para un mayor estudio de *Sargassum sp.*, se debe ampliar la investigación para la obtención de secuencias homólogas de los genes de biosíntesis de alginato.
- Diseñar cebadores para obtener las secuencias completas de los genes algC, algD y algG de biosíntesis de alginatos *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia*.
- A partir del conjunto “cebadores” de los genes algC, algD y algG diseñados para PCR convencional, analizarlos y aplicarlos a otros individuos de la división Phaeophyta.
- Optimizar el protocolo de extracción de alginato de sodio *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis integrifolia* y *Sargassum sp.*

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEJOS, L., ARAGÓN, M. & CORNEJO, A. (2015). Extracción y purificación de ADN. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- ALTSCHUL, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids*, 1997, Vol. 25, No. 17 3389–3402
- ARENAS, M. (2016). “Determinación de los parámetros tecnológicos para la obtención de alginato de sodio a partir de aracanto (*Lessonia nigrescens*)”. Tesis Para optar el Título Profesional de: Ingeniero Pesquero. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa.
- AVENDAÑO, G. LÓPEZ, A. & PALOU, P. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de los alimentos*. 7(1), 87-96.
- AYARZA, J. (2015). Extracción y caracterización de alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis* *sp.* Disponible en: [http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/6443/AYARZA\\_JORGE\\_LUIS\\_ALGINATO\\_MACROSYSTIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/6443/AYARZA_JORGE_LUIS_ALGINATO_MACROSYSTIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- BOLIVAR, A., ROJAS, A., & GARCIA, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed*; 3: 25-33
- BUSCHMANN, A., VÁSQUEZ, J. A., OSORIO, P., REYES, E., FILÚN, L., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C., & VEGA, A. (2004). The effect of water movement, temperature and salinity on abundance and reproductive of patterns of *Macrocystis* spp. (Phaeophyta) at different latitudes in Chile. *Marine Biology*, 145(5), 849–862. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1393-8>



- CAMACHO, O. (2003). El género *Sargassum* C. Agardh 1820 (Phaeophyta - fucales) del Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe Colombiano. Tesis de grado para optar título de Biologo Marino. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Disponible en: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/1336/T641.pdf?sequence=1>
- CAMACHO, O. & HERNANDEZ, G. (2012). Fenología y alginatos de dos especies de *Sargassum* de la costa caribe de Colombia. *Ciencias Marinas*. 38(2): 381–393. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v38n2/v38n2a4.pdf>
- CAMACHO, O., MATTIO, L., DRAISMA, S., FREDERICQ, S., & DIAZ, G. (2015). Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, 13(2), 105–130. <https://doi.org/10.1080/14772000.2014.972478>
- CHARRIER, B. et al. (2007). Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research Journal compilation. *New Phytologist*, 177: 319–332. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02304.x
- CERDA, D. & DÍAZ, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. 82-92. Disponible en: <https://C:/Users/jorge/Downloads/1089-Texto%20del%20art%C3%ADculo-3832-1-10-20130527.pdf>
- CHA, R. & THILLY, W.. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl.*3:S18-29
- CHI, S. et al. (2017). Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina*.
- CIOCHINNI, A. & NIEMIROWICZ, G. (2018). Ácidos nucleicos. Disponible en: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2018/Qui>

[micaBiol/1527862563.pdf](https://doi.org/10.1038/nature09016)

- COCK, J. M., STERCK, L., ROUZÉ, P., SCORNET, D., ALLEN, A. E., AMOUTZIAS, G., ... WINCKER, P. (2010). The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465(7298), 617–621. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nature09016>
- CORTAZAR, A. & SILVA, E. 2004. Métodos Físico-Químicos En Biotecnología “PCR”. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- DETTMAR, P., STRUGALA, V. & CRAIG, J. (2011). The key role alginates play in health. *Food Hydrocolloids*, vol. 25, N°. 2, pp. 263–266.
- DUGUET, J. (2017). Ingeniería metabólica en *saccharomyces cerevisiae* para la degradación de alginato de sodio. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias de la Ingeniería, mención ing. Química y biotecnología. Universidad de Chile. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/149551/Ingenieria-metabolica-en-saccharomyces%20cereviaiae-para-la-degradacion-de-alginato-de-sodio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- ERTESVAG, H., SLETTA, H., SENNESET, M., SUN, Y., KLINKENBERG, G., AURSAND, T., ELLINGSEN, T. & VALLA, S. (2017). Identification of genes affecting alginate biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by screening a transposon insertion library. *BMC Genomics*. DOI 10.1186/s12864-016-3467-7
- ESPINOSA, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*, 11(11), 517–540. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6584-110034>
- FENG, Y., CHI, S., LIU, C., CHEN, S., YU, J., WANG, X., & LIU, T. (2014). The discovery of archaea origin phosphomannomutase in algae based on the algal transcriptome. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(2), 108–113. <https://doi.org/10.1007/s13131-014-0447-0>
- FOX, C., & SWANSON, A. (2007). Nested PCR detection of microscopic life-stages of laminarian macroalgae and comparison with adult forms along intertidal height

- gradients. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 1–10. Disponible en: <https://doi.org/10.3354/meps332001>
- FUNAMI, T. et al. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7):1746- 1756.
- FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA - FIA. (2016). Patrimonio Alimentario de Chile. Productos y Preparaciones de la Región del Biobío. Santiago, Chile.
- GACESA, P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis recent progress and future prospects. *Microbiology*, vol. 144, N° 5, pp. 1133–1143.
- GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO MUNICIPAL DE SANTA ELENA. (2019). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial. Santa Elena – Ecuador.
- GODHE, A., ANDERSON, D. M., & REHNSTAM-HOLM, A. S. (2002). PCR amplification of microalgal DNA for sequencing and species identification: Studies on fixatives and algal growth stages. *Harmful Algae*, 1(4), 375–382. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00049-5)
- GOJON, H. (1997). Degradabilidad in situ y digestibilidad ruminal de *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyta) y *sargassum spp* (Fuciales, Phaeophyta) en ganado bovino. Tesis que para obtener el título de biólogo marino. Universidad Autónoma De Baja California Sur. Disponible en: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE857.pdf>
- GOMEZ, L. FANDIÑO, M. & PRIETO, M. (2017). Cuantificación de ADN por espectrofotometría de UV-VISIBLE y visualización por electroforesis en gel de agarosa. Universidad Nacional San Francisco José de Caldas.
- GOUJON, I. (2004). Los alginatos: excipientes de origen marino utilizado en la industria, aplicaciones en la industria farmaceutica y síntesis de geles.

- GRATTAPAGLIA, D. (1994). Genetic mapping of quantitatively inherent economically important traits in *Eucalyptus* Ph.D. Dissertation, North Carolina State University. Pp 289.
- HELGERUD, T. et al. (2010). Alginates. In Food stabilizers, thickeners and gelling agents. pp. 50-72.
- HOEFER, D., et al (2015). Biotechnologically produced microbial alginate dressings show enhanced gel forming capacity compared to commercial alginate dressings of marine origin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, N° 4, article 162.
- INOUE, A. & OJIMA, T. (2016). Functional identification of alginate lyase from the brown alga *Saccharina japonica*. *Scientific Reports*. Disponible en <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41351-6>
- INSTITUTO DEL MAR PERUANO – IMARPE. (s.f.). Disponible en : [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro\\_algas/arch\\_macroal/Macrocystis.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro_algas/arch_macroal/Macrocystis.pdf)
- INDERGAARD, M., & SKJATK-BRAEK, G. (1987). Characteristics of alginate from *Laminaria digitata* cultivated in a high-phosphate environment. *Hydrobiologia*, 151–152(1), 541–549. <https://doi.org/10.1007/BF00046180>
- LÓPEZ, P., LÓPEZ, A. & MARULANDA, M. (2011). Estandarización de la extracción de ADN genómico en *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. Y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Okén. Pp: 28-41.
- LUPO, B., GONZÁLES, C. & MAESTRO, A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130-151
- MACAYA, E. C. (2010). Phylogeny, connectivity and dispersal patterns of the giant kelp *Macrocystis* (Phaeophyceae), *Doctor of*, 175.
- MACAYA, E., BOLTAÑA, S., HINOJOSA, I., MACCHIAVELLO, J., VALDIVIA, N.,

- VÁSQUEZ, N., THIEL, M. (2005). Presence of sporophylls in floating kelp rafts of *Macrocystis spp.* (Phaeophyceae) along the Chilean Pacific Coast. *Journal of Phycology*, 41(5), 913–922. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00118.x>
- MACARTAIN, P., GILL, C., BROOKS, M., CAMPBELL, R. & ROWLAND, I. (2007). Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* 2007:535–543. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00278.x>
- MCHUGH D. (1987). Production, properties and uses of alginates. In: McHugh DJ (ed.), *Production and Utilization of Products from Seaweeds*. pp. 58–115.
- MANSILLA, A. & ALVEAL, K. (s.f.). Generalidades sobre las macroalgas. *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. Disponible en: <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/BioMarina/12.pdf>
- MENDOZA-CARRIÓN, G. (2003). Estructura genética de *Sargassum lapazeanum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) en escalas intrapoblacional, local y regional: estimación de posibles patrones de dispersión.
- MENESES, C., ROZO, L. & FRANCO, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*. 49:116-122
- MICHEL, G. et al (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*, 188(1), 82–97. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03374.x>
- MONROY, E., FERNÁNDEZ, C., DÍAZ, R., MARTÍNEZ, G., ILLNAIT, M., & PERURENA, M. (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*, 23(2), 49–56.
- MORENO, R. (2012). Identification of algal strains by PCR amplification and evaluation of their FA profiles for biodiesel production, 88.
- NYVALL, P. et al (2003) Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the

brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* 133:726–735

NORDERHAUG, K., CHRISTIE, H., & RINDE, E. 2002. Colonisation of kelp imitations by epiphyte and holdfast fauna; a study of mobility patterns. *Marine Biology*, 141(5), 965–973. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0893-7>

NN. (2017). Marcona un paraíso por conocer. Disponible en: [http://www.marcobre.com/wp-content/uploads/2017/08/Gui%CC%81a\\_web\\_baja-1.pdf](http://www.marcobre.com/wp-content/uploads/2017/08/Gui%CC%81a_web_baja-1.pdf) (accesado en 17 de julio de 2019).

NÚÑEZ, R. & CASAS, M. (1995). Fenología de las especies de *Sargassum* (Fucales: Sargassaceae) en tres zonas de Bahía Concepción, B. C. S., México. *Rev. Biol. Trop.*, 44(2): 455-464, 1996

OSORIO, A. & TAPIERO, J. (2014). Diseño de cebadores a partir del análisis bioinformático de secuencias de bacterias y hongos productores de la enzima Endoxilanas presentes en compostaje de Higuierilla. Trabajo de tesis para optar al título de Bacteriólogas. Universidad Católica de Manizales. Disponible en: <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/701/Alejandra%20Osorio%20Gonzalez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PACHECO, Y., GUEVARA, F. & DÍAZ, A. (2016). Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of Molecular Mechanisms in Connection with the Oxygen Availability. *International Journal of Polymer Science*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2062360>

PETRONI, E. (1994). Análisis genético-molecular y bioquímico de genes Esenciales en la biosíntesis de exopolisacáridos en bacterias Gram-negativas. Tesis presentada para optar al título de doctor Ciencias Químicas. Universidad De Buenos Aires.

PHOEBE, Y. (2005). Bioinformatics Technologies. Alemania: *Springer-Verlag* Berlin Heidelberg. pp 396.

QIAN, W., YU, C., QIN, H., LIU, X., ZHANG, A., JOHANSEN, I. E., & WANG, D. (2007). Molecular and functional analysis of phosphomannomutase (PMM) from higher

- plants and genetic evidence for the involvement of PMM in ascorbic acid biosynthesis in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, 49(3), 399–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02967.x>
- QIN, S., JIANG, P., & TSENG, C. (2005). Transforming kelp into a marine bioreactor. *Trends in Biotechnology*, 23(5), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.010>
- QUINGA, M. (2012). Estandarización de un protocolo para la extracción de ADN de muestras fecales de lobo paramo (*Lycalopex culpaeus*). Tesis para optar el título de Ingeniero en biotecnología. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5749/1/T-ESPE-033979.pdf>
- QUITRAL, V., MORALES, C., SEPÚLVEDA, M. & SCHWARTZ, M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Rev Chil Nutr Vol.* 39 (4), 196-204. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v39n4/art14.pdf>
- RAT, M., JOVANOVIĆ, Z., STANISAVLJEVIĆ, N., RADAK, B., RADOVIĆ, S., & ANACKOV, G. (2014). A simple and efficient DNA isolation method for *Ornithogalum L.* species (Hyacinthaceae, Asparagales), 38(1), 185–189.
- RHEIN, N., ALE, M. & MEYER, A. (2015). Seaweed hydrocolloid production: an update on enzyme assisted extraction and modification technologies. *Marine Drugs*, vol. 13 pp. 3340–3359.
- RÍOS, E., CALLEROS, E., GONZÁLEZ, A., RUBIO, J., MARTÍNEZ, O., MARTÍNEZ, A., HERNÁNDEZ, S., & PÉREZ, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. 26, 56-64. Doi: 10.15174/au.2016.1078
- RODRÍGUEZ, G. (2014). Cuantificación de ácidos nucleicos. Disponible en: <https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/CUANTIFICACION+DE+%C3%81CIDOS+NUCLEICOS+V2.pdf/04333940-c6ff-4419-ad85-cfd1e04dbca8>
- RODRÍGUEZ, I. & BARRERA, H. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos

décadas de su invención. *Ciencia UANL* 7:323-35

- SABRA, W., ZENG, A. & DECKWER, W. (2001). Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects,”*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 56, pp. 315–325..
- SALAVARRÍA, E. (2014). “Análisis de la variabilidad genética de *Macrocystis spp.* (Laminariales) en la costa centro sur del Perú, empleando marcadores mitocondriales.”. Tesis Para Optar El Grado De Magister Scientiae En Ecología Aplicada Universidad. Nacional Agraria La Molina. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1914/F30-S3439-T.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU
- SMITH, T. & WATERMAN, M. (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147(1), 195–197. Doi: 10.1016/0022-2836(81)90087-5
- SWIFT, S., HUDGENS, J., HESELPOTH, R., BALES, P., & NELSON, D. 2014. Characterization of AlgMsp, an alginate lyase from *microbulbifer sp.* 6532A. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112939>
- TAYLOR, W. (1945). Pacific marine algae of the Allan Expedition to the Galapagos island. Allan Hancock Pacific Expedition. (12) 528.
- TENHAKEN, R., VOGLAS, E., COCK, J., NEU, V., & HUBER, C. (2011). Characterization of GDP-mannose dehydrogenase from the brown alga *Ectocarpus siliculosus* providing the precursor for the alginate polymer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16707–16715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230979>
- TING, J. T., DAIGLE, T. L., CHEN, Q., & FENG, G. (2014). *Methods and Protocols*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0>



- TONON, T., ROUSVOAL, S., ROEDER, V., & BOYEN, C. (2008). Expression profiling of the mannuronan C5-epimerase multigenic family in the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) under biotic stress conditions. *Journal of Phycology*, 44(5), 1250–1256. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00580.x>
- URIBE, P., HERRERA, J., OROZCO, N., & BETANCUR, J. (2013). Uso alternativo del colorante GelRed en la tinción de ácidos nucleicos. *Archivos de Medicina*, 13, 160–166.
- VEGA, F., CUPUL, A., NOLASCO, H. & CARRILLO, O. 2006. Las algas marinas *Sargassum* sp. y *Macrocystis pyrifera*: ¿una alternativa para el forraje del ganado bovino en la península de Baja California?. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 40, No. 4: 439-450.
- VELÁZQUEZ, C., SÁNCHEZ, E., COCOTL, M., MONTES, L., CARREÑO, L., NUÑEZ, C., ESPÍN, G. & CASTAÑEDA, M. (s.f.). Regulación de la biosíntesis de alginatos por el sistema de control posttranscripcional rsmA/b en *Azotobacter vinelandii*. Disponible en: [https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_VIII/CARTELES/CVIII-13.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_VIII/CARTELES/CVIII-13.pdf)
- VELÁZQUEZ, L., ARAGÓN, C., & ROMERO, A. (2008). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 1–26. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- VENKATESAN, J., et al. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 72, pp. 269–281.
- WANG, R., WANG, X., ZHANG, Y., YU, J., LIU, T., CHEN, S., & CHI, S. (2014). Origin and evolution of alginate-c5-mannuronan-epimerase gene based on transcriptomic analysis of brown algae. *Acta Oceanologica Sinica*, 33(2), 73–85. <https://doi.org/10.1007/s13131-014-0443-4>
- YABUR, R. (2005). Producción y propiedades de alginato de *sargassum sinicola* (setchell y

gardner) y su aplicación en inmovilización celular.

- YAGNENTKOVSKY, N. (2011). Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados, 161. Disponible en: [http://hdl.handle.net/10915/2706%5Cnfiles/517/Yagnentkovsky\\_-2011\\_-\\_Aplicación\\_de\\_técnicas\\_de\\_biorremediación\\_para\\_el\\_.pdf%5Cnfiles/579/2706.html](http://hdl.handle.net/10915/2706%5Cnfiles/517/Yagnentkovsky_-2011_-_Aplicación_de_técnicas_de_biorremediación_para_el_.pdf%5Cnfiles/579/2706.html)
- ZHANG, P., SHAO, Z., JIN, W., & DUAN, D. (2016). Comparative characterization of two GDP-mannose dehydrogenase genes from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae). *BMC Plant Biology*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0750-3>
- ZHANG, P., SHAO, Z., LI, L., LIU, S., YAO, J., & DUAN, D. (2018). Molecular characterisation and biochemical properties of phosphomannomutase/phosphoglucomutase (PMM/PGM) in the brown seaweed *Saccharina japonica*. *Journal of Applied Phycology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1460-z>

# ANEXOS

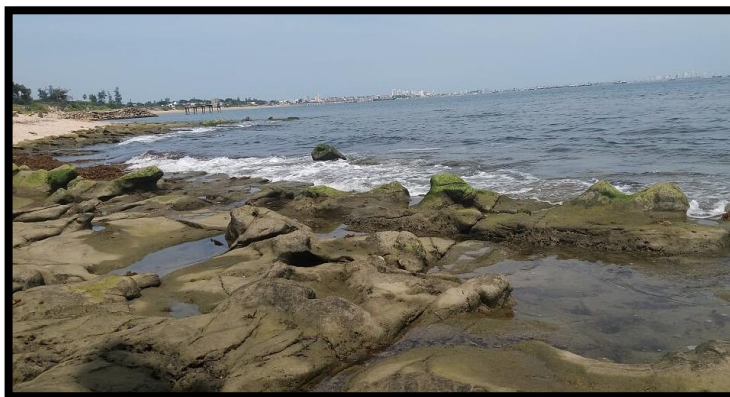
**ANEXO 1.** Muestras conservadas en silica gel de *Macrocystis pyrifera*, en la zona del Bio-Bio – Chile.



**ANEXO 2.** Colecta de *Sargassum sp.* en Santa Elena-Ecuador.



Alga parda *Sargassum sp.* Varada en el litoral de Santa Elena – Ecuador.



Zona de muestreo para la colecta de *Sargassum sp.*



Muestra limpia de *Sargassum sp.* Para ser conservada en silica gel.

**ANEXO 3.** Colecta de *Macrocystis pyrifera* y *Macrocystis integrifolia* en San Juan de Marcona – Ica.



1. Extracción y colecta de *M. integrifolia* (Zona intermareal)



2. Limpieza del alga y remoción de epifitas.



3. Toma de muestra (Fronδας limpias)



## ANEXO 4. Diseño de cebadores algC, algD y algG

\*Al ingresar al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), se debe colocar las accesiones indicadas en la tabla 3.2.

\***alineamiento múltiple:** Las secuencias encontradas de biosíntesis de alginato deben de alinearse mediante un programa informático, en este caso se usó Clustal Omega, para obtener zonas consenso en donde se diseñaran los cebadores.

Input form	Web services	Help & Documentation	Bioinformatics Tools
E.	GAGGGCCGGTCCTTCATTGCTGCATCA-----CCCAGTACGACGACAACCTACAGTTGC	1131	
L.	-----GAATTCGGCAGAGGAGATCATCACCAGCAGCAAGGAGAAGTGC	45	
S.	AAGGGCCGGTCGTACATTAGTGCCGTGTCGGAGGTGATCACCAGCAGCAAGCAGAAATGC	567	
	* **** * * *		
E.	AGCGGTGGTTCGAACAAGGATATGGGCACGTGTCGATGGATATCATCGACTCTACCATG	1191	
L.	AACGGTAAGGCCAAGAAAACGATGGGGGAGGCAAGAATGGACATTGAGGACAGCGAGATG	105	
S.	GACGGCAGGGCGAAGAAGAATATGGGGAGGCGCGGATGGACATCGAGGACAGCGAGATG	627	
	*** * * * * * * * * * * *		
E.	GGCAACATGGGTACGACGCTTCCGAGAGCTACGGCTTACATGGAAGGTCCGCGGTTTG	1251	
L.	GCTTACCTCGGATACCAAGGGAGCGAGAGCTATGGCTCACGTGGAAGGTGCGAGGTTTC	165	
S.	GCCTACCTCGGCTATTTCCGATCCGAGAGCTACGGCTAACCTGGAAGGTTCCGGGGCTC	61	
	* * * * * * * * * * * * * * * * *		
E.	TGCAAGAACTTGTCACCTGAAGCTCTTCGACAAGCGCAATGTCTACGGCGACATCAAG	1311	
L.	TGCAAGGACGGAAGCAACCGGAAGTGTTCGACGAGGTCAACGTCTACGGCAACATCTAC	225	
S.	TGCAAGGACCTGAGCAACCTGGAAGTGTTCGACGCGGTTAATGTCTACGGGAACATCTAC	747	
	*** * * * * * * * * * * * * * * *		

ATGTCCGTGGGGTGCGCCGACAACGTGTTCTCTAAGAACGACATCACCGGTTCTTC  
CAAGTACAACGTTTACACGTACCAGGGATCCGATGCCCCGTGGGTGGTCGATTCCG  
GGCGGTGCGCAGGACAACGTCTTCTCGGACAACAACATAAGCGGCGGCCAGGAGAC  
CGTCAAGCTCACCATGGCGGACGGCACCAGTTTCATCGACAACACCTTCAAGAGCG  
CTAAGACGATACGCTTCGAGGACTGCCAGGGAACCCT

The screenshot shows the top navigation bar of the IDT website. The 'TOOLS' tab is selected. A red box highlights the 'qPCR ASSAY DESIGN' link, with a red arrow pointing to it and a red '3' next to it, indicating it is the third link in the row.

PRODUCTS & SERVICES	SUPPORT & EDUCATION	TOOLS	COMPANY
<b>OLIGO DESIGN &amp; HANDLING</b> OligoAnalyzer Tool UNAFold Tool Resuspension Calculator Dilution Calculator	<b>CRISPR GENOME EDITING</b> Alt-R Pre-designed Cas9 crRNA Selection Tool Alt-R Custom Cas9 crRNA Design Tool CRISPR-Cas9 Design Checker	<b>qPCR ASSAY DESIGN</b> Primer Quest Tool Realtime PCR Tool Pre-designed qPCR Assays PrimeTime Multiplex Dye Selection	<b>GENE REGULATION AND RNAI</b> Pre-designed DsiRNA Selection Tool RNAi Design Tool
<b>GENOTYPING</b>	<b>GENES &amp; GENE FRAGMENTS</b>	<b>NGS TOOLS</b>	

Sequence 1, Assay Set 1 Details		4
BACK TO RESULTS		
Parameter Set: General PCR (Primers only)		
Sequence Name:		
Amplicon Length: 233		
Forward	GACCTGAACCTTGAGATTGTG (Sense)	Start 168 Stop 189 Length 21 Tm 62 GC% 52.4
Reverse	TGGACCGGATGACGAAGATA (Anti-Sense)	381 401 20 62 50

92



## OligoAnalyzer

5

Sequence

3' MOD

INTERNAL

3' MOD

MIXED BASES

GACCTGAACCTGAGATTGTG

Bases 21

CLEAR SEQUENCE

Try the new batch mode here

Parameter sets

SpecSheet (Default)

Target type

DNA

Oligo Conc

0.25

μM

Na<sup>+</sup> Conc

50

mM

Mg<sup>2+</sup> Conc

0

mM

dNTPs Conc

0

mM

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

- ANALYZE
- HAIRPIN
- SELF-DIMER
- HETERO-DIMER
- NCBI BLAST
- TM MISMATCH
- ADD TO ORDER

\*En IDT por sus siglas en inglés (Integrated DNA Technologies) podemos analizar los cebadores diseñados y verificar que no formen dímeros entre sí.

### Anexo 5. Protocolo descrito por Doyle&Doyle 1990

- Separar el tejido vegetal a extraer (Hojas jóvenes plantas sanas)
- Macerar 100 mg en nitrógeno líquido utilizando mortero y pestillo. Colocar en un tubo de microcentrifuga (1,5 ml)
- Añadir 400 μL de bufer de extracción y agitar brevemente en un vortex
- Incubar a 65°C durante 30 min
- Dejar a temperatura ambiente y añadir 400 μL de cloroformo-isoamilalcohol 24:1. Agitar suavemente por inversión durante 5 min.
- Centrifugar a 14 mil rpm por 5 min.
- Retirar el sobrenadante y transferir a un tubo limpio (aproximadamente 200 μL).
- Añadir 200 μL isopropanol frío y homogeneizar por inversión durante 1 min.
- Incubar a -20°C por 30 min mínimo a 2 h.
- Centrifugar a 14 mil rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante, sin desprender el precipitado del tubo.
- Adicionar 200 μL de etanol al 70% frío.
- Centrifugar a 14 mil rpm por 5 min. . Descartar el sobrenadante, sin desprender el precipitado del tubo. Dejar secar en papel toalla por aproximadamente 30 min.

También se puede incubar a 50°C por 45 min con la tapa del microtubo abierta en una estufa.

- Resuspender el ADN en 100 µL de bufer TE.
- Tratar con ARNasa (5 mg/mL). Incubar a 37°C por 30 min. Esta reacción se detiene calentando a 65°C por 15 min o añadiendo 2 µL de EDTA 0.5 M.
- Almacenar a 8 -12°C por más de 6 h para resuspender.
- Adicionalmente se puede medir la concentración del ADN en un espectrofotómetro y verificar su calidad corriendo un gel (5 µL ADN más 2 µL bufer de carga).
- Almacenar a -20°C hasta su uso.

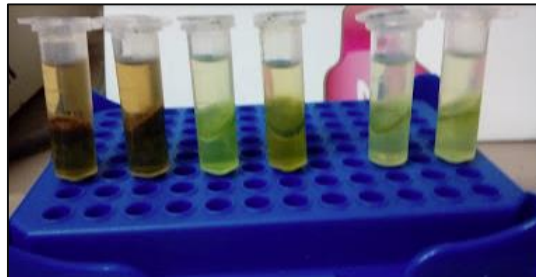
#### ANEXO 6. Procedimiento de extracción de ADN genómico, siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle 1990.



**Mecánica:** molienda con nitrógeno líquido en mortero de porcelana previamente esterilizado



**Lisis química:** Incubación a 65°C por dos horas en Termobloque, previa homogenización en vortex.



**Precipitación de proteínas y fenoles:** Se aprecia la fase acuosa y los residuos orgánicos



Precipitación de ADN genómico.



Eliminación de residuos de etanol en desecador y elución de ADN con agua ultrapura, volumen final 30ul.

## **ANEXO 7.** Preparación de Gel de agarosa al 1%

- En un matraz Erlen-Meyer de 500 mL agregue el volumen de buffer de electroforesis 1x (ya sea TAE o TBE, correspondiente al grosor del gel deseado).
- Pese la cantidad correspondiente de agarosa según el porcentaje, volumen y grosor del gel deseado.
- Coloque el matraz (junto con el buffer y la agarosa) en el horno microondas, caliente a potencia total durante 1 o 2 minutos evitando en lo posible la ebullición de la agarosa.
- Retire el matraz del horno microondas con el guante de protección térmica y coloquelo sobre una superficie plana.
- Permítasele al matraz enfriarse durante tres minutos, luego vacíe su contenido sobre el cassette de electroforesis previamente sellado con cinta adhesiva o con los sellos de acrílico originales.
- Coloque los peines necesarios en el gel.
- Permítasele gelificar por completo durante al menos 30 minutos protegiéndolo de corrientes de aire directas. Evite el uso de toallas de papel cerca de los geles de agarosa para evitar cotaminarlo con fibras que exhiban fluorescencia ultravioleta.
- Prepare 2 litros de buffer de electroforesis para el tanque (TAE o TBE).
- Después de los 30 minutos, retire la cinta adhesiva del cassette y colóquelo dentro del tanque de electroforesis.
- Vierta la cantidad apropiada de buffer de electroforesis (del mismo tipo empleado para preparar el gel). El buffer solamente deberá cubrir discretamente (no más de 1 mm de altura) a los pocillos del gel).
- Retire los peines del gel cuidadosamente para evitar romper los pocillos.
- Cargue el gel con producto de PCR o ácido nucleico tomando en cuenta el volumen máximo recomendado para cada peine, tal cual se expone en la siguiente tabla.
- Enjuague todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida.
- Reutilice el buffer de electroforesis o elimínelo hacia un matraz Kitasato empleando el sistema de bomba de vacío.

## **ANEXO 8.** Preparación de BUFFER TAE 50X

Prepare una solución madre 50X en 1 L de H<sub>2</sub>O:

- 242 g de base Tris
- 57.1 mL de ácido acético (glacial)
- Precaución 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0)
- Se pesó con balanza analítica los reactivos respectivos, para diluir el EDTA 0.5M se debe mezclar la solución con hidróxido de sodio, se midió el pH 8.0 mediante pH-metro, se aforo la solución hasta un volumen de 1000ml, posteriormente se autoclavó el buffer 50X.
- La concentración del buffer 50X fue llevada a una concentración menor de buffer TAE 1X, para su posterior utilidad en electroforesis agarosa 1%.

## **ANEXO 9.** Protocolo de Camacho & Hernández-Carmona 2012 “Extracción de alginato de sodio”

- Las muestras de algas para la extracción de alginatos se recolectaron durante el periodo de máxima abundancia (abril–mayo) y se secaron al sol (temperatura ambiente de 30 – 40°C) hasta obtener un peso constante (aproximada- mente 4 h, 12% humedad).
- Las algas se molieron a un tamaño de 30 mallas con un molino de martillos. Para la extracción del alginato, se rehidrataron 30 g de alga seca durante una noche con 180 mL de agua destilada y 0.18 mL de formaldehído.
- La solución se filtró y el líquido fue descartado. Las algas fueron tratadas con 200 mL de solución de HCl a pH 4 durante 15 min y con agitación constante.
- Después de la filtración, las algas fueron tratadas con 200 mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 10 y 80 °C durante 2 h en baño María, con agitación constante a 800 rpm usando un agitador externo (Caframo) y propela.

- El alginato extraído se filtró al vacío para separar el alga residual (principalmente celulosa), y el alginato en solución se precipitó con un volumen igual de etanol, agitando lentamente con una varilla de vidrio. Las fibras precipitadas de alginato se enrollaron a la varilla. Las fibras se removieron, se desenredaron, se lavaron con alcohol y se secaron a 50 °C durante 24. El alginato se pesó y el porcentaje de alginato se calculó con base en el peso inicial del alga.
- La propiedad gelificante del alginato de cada especie se obtuvo preparando una solución de alginato al 1% en agua destilada y llenando un tubo de membrana de diálisis (5 cm de diámetro × 2.5 cm de altura). Los tubos se sumergieron en una solución de cloruro de calcio (10%) durante una noche para formar los geles.

**ANEXO 10.** Extracción de alginatos según el protocolo Camacho & Hernández-Carmona 2012.



**Secado de frondas para estimar el peso seco.**



**Molienda de las frondas secas**





Pre extracción acida con HCl pH 4



Filtrado después la pre extracción acida



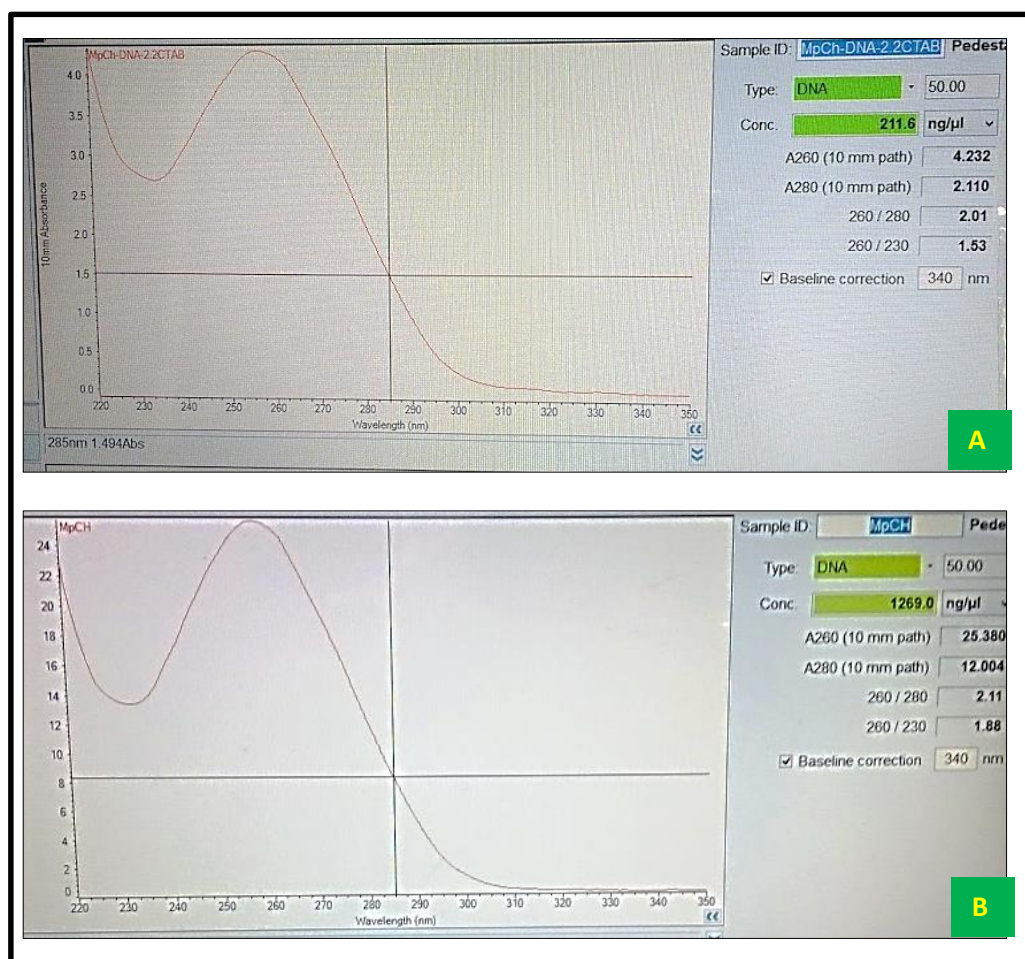
Pre extracción básica con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 10



Precipitación de fibras de alginato de sodio con etanol 96%.

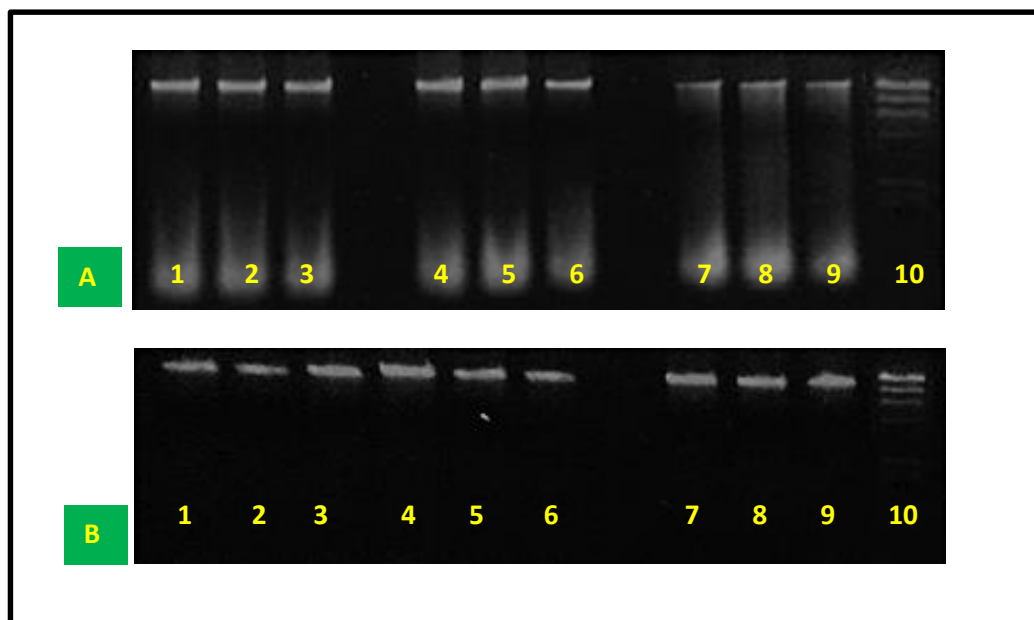


## ANEXO 11. Lectura en Nanodrop 2000 thermo scientific



\* A: Extracción de ADN (Protocolo no estandarizado), B: Extracción de ADN (Protocolo estandarizado),

**ANEXO 12.** Extracción de ADN Protocolo Doyle &Doyle 1990 y protocolo estandarizado.



\*Electroforesis en gel 1% de agarosa, A: Extracción de ADN (Protocolo no estandarizado), B: Extracción de ADN (Protocolo estandarizado), *Macrocystis pyrifera* (Perú) (Carril N° 1 , 2 y 3); *Macrocystis integrifolia* (Perú) (Carril N° 4, 5 y 6); *Sargassum sp.* (Ecuador) (Carril N° 7, 8 y 9); Marcador (Carril N°10).

# **ANEXO 13.** Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algC* en *Macrocystis pyrifera*

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy			
Sequences producing significant alignments						
Download						
Manage Columns						
Show						
100						
select all 69 sequences selected						
GenBank						
Graphics						
Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharina japonica phosphomannomutase mRNA, complete cds	315	315	100%	6e-82	93.36%	KP772272.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104000728). mRNA	91.5	91.5	72%	1e-14	73.68%	XM_009422839.2
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Erythranthe guttatus uncharacterized LOC105965964 (LOC105965964). mRNA	86.0	86.0	44%	5e-13	80.85%	XM_012990507.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Prosopis alba phosphomannomutase/phosphoglucomutase-like (LOC114717876). mRNA	82.4	82.4	36%	6e-12	84.42%	XM_028903100.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104100389). transcript variant X2. mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_009607601.2
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104100389). transcript variant X1. mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_009607600.2
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana tabacum phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC107803921). transcript variant X2. mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_016627722.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana tabacum phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC107803921). transcript variant X1. mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_016627713.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Phoenix dactylifera phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC103721410). mRNA	74.3	74.3	73%	3e-09	70.97%	XM_008811608.2
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Camellia sinensis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC114316553). mRNA	73.4	73.4	69%	3e-09	71.43%	XM_028263226.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ipomoea trifida cultivar NCNSP0306 chromosome 4	72.5	72.5	44%	1e-08	77.66%	CP025647.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana attenuata phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC109236829). mRNA	70.7	70.7	44%	4e-08	77.42%	XM_019403062.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana sylvestris uncharacterized LOC104247987 (LOC104247987). mRNA	70.7	70.7	44%	4e-08	77.42%	XM_009804159.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ipomoea triloba cultivar NCNSP0323 chromosome 4	68.0	68.0	44%	1e-07	76.60%	CP025663.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gossypium turneri isolate D10-2 chromosome D10_01	67.1	67.1	36%	5e-07	80.26%	CP032571.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gossypium raimondii isolate D5-4 chromosome D5_01	67.1	67.1	36%	5e-07	80.26%	CP032571.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Gossypium arboreum phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC108466801). mRNA	67.1	67.1	36%	5e-07	80.26%	XM_019403062.1

# **ANEXO 14.** Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algC* en *Macrocystis integrifolia*

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments							
Download Manage Columns Show 100							
select all 69 sequences selected							
GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
	Saccharina japonica phosphomannomutase mRNA, complete cds	315	315	100%	6e-82	93.36%	KP772272.1
	PREDICTED: Musa acuminata subsp. malaccensis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104000728).mRNA	91.5	91.5	72%	1e-14	73.68%	XM_009422839.2
	PREDICTED: Erythranthe guttatus uncharacterized LOC105965964 (LOC105965964).mRNA	86.0	86.0	44%	5e-13	80.85%	XM_012990507.1
	PREDICTED: Prosopis alba phosphomannomutase/phosphoglucomutase-like (LOC114717876).mRNA	82.4	82.4	36%	6e-12	84.42%	XM_028903100.1
	PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104100389).transcript variant X2.mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_009607601.2
	PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC104100389).transcript variant X1.mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_009607600.2
	PREDICTED: Nicotiana tabacum phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC107803921).transcript variant X2.mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_016627722.1
	PREDICTED: Nicotiana tabacum phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC107803921).transcript variant X1.mRNA	79.7	79.7	44%	8e-11	79.57%	XM_016627713.1
	PREDICTED: Phoenix dactylifera phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC103721410).mRNA	74.3	74.3	73%	3e-09	70.97%	XM_008811608.2
	PREDICTED: Camellia sinensis phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC114316553).mRNA	73.4	73.4	69%	3e-09	71.43%	XM_028263226.1
	Ipomoea trifida cultivar NCNSP0306 chromosome 4	72.5	72.5	44%	1e-08	77.66%	CP025647.1
	PREDICTED: Nicotiana attenuata phosphomannomutase/phosphoglucomutase (LOC109236829).mRNA	70.7	70.7	44%	4e-08	77.42%	XM_019403062.1
	PREDICTED: Nicotiana sylvestris uncharacterized LOC104247987 (LOC104247987).mRNA	70.7	70.7	44%	4e-08	77.42%	XM_009804159.1
	Ipomoea triloba cultivar NCNSP0323 chromosome 4	68.0	68.0	44%	1e-07	76.60%	CP025663.1
	Gossypium turneri isolate D10-2 chromosome D10_01	67.1	67.1	36%	5e-07	80.26%	CP032571.1

## ANEXO 15. Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algD* en *Macrocytis pyrifera*

Sequences producing significant alignments		Download	Manage Columns	Show	100		
<input checked="" type="checkbox"/> select all 16 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose dehydrogenase 2 (GMD2) mRNA complete cds</a>	533	533	42%	5e-147	96.31%	KY296309.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose 6-dehydrogenase 1 mRNA complete cds</a>	533	533	42%	5e-147	96.31%	KP172530.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens ST2 gene promoter region partial sequence</a>	406	506	52%	2e-108	90.43%	LC437684.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens ST2 gene promoter region partial sequence</a>	406	506	52%	2e-108	90.43%	LC437682.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens BAC clone RP11-315O22 from 2 complete sequence</a>	406	506	52%	2e-108	90.43%	AC007248.4
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens ST2 gene promoter region partial sequence</a>	401	502	52%	2e-107	90.10%	LC437683.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Homo sapiens FOSMID clone ABC10-72268D1 from chromosome 2 complete sequence</a>	401	502	52%	2e-107	90.10%	AC213437.4
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pan troglodytes chromosome 2 clone CH251-17A9 complete sequence</a>	392	493	52%	1e-104	89.44%	AC275841.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pan troglodytes chromosome 2 clone CH251-486H4 complete sequence</a>	392	493	52%	1e-104	89.44%	AC275837.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pan troglodytes chromosome 2 clone CH251-446A20 complete sequence</a>	392	493	52%	1e-104	89.44%	AC275803.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pan troglodytes chromosome 2 clone CH251-525C13 complete sequence</a>	392	493	52%	1e-104	89.44%	AC275801.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Pan troglodytes chromosome 2 clone CH251-181M9 complete sequence</a>	383	484	52%	6e-102	88.78%	AC275807.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose dehydrogenase 1 (GMD1) mRNA complete cds</a>	287	287	35%	1e-72	83.46%	KY296308.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose 6-dehydrogenase 2 mRNA complete cds</a>	287	287	35%	1e-72	83.46%	KP172531.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces griseorubiginosus strain 3E-1 chromosome complete genome</a>	68.0	68.0	6%	6e-07	88.46%	CP032427.1
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Capsicum annuum clone BAC534N9 complete sequence</a>	44.6	44.6	5%	6.7	84.62%	KU836645.1

## ANEXO 16. Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algD* en *Macrocytis integrifolia*

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments				Download	Manage Columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 5 sequences selected				GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose dehydrogenase 2 (GMD2) mRNA complete cds</a>	305	377	61%	3e-78	87.40%	<a href="#">KY296309.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose 6-dehydrogenase 1 mRNA complete cds</a>	302	370	60%	1e-77	87.60%	<a href="#">KP172530.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose dehydrogenase 1 (GMD1) mRNA complete cds</a>	266	325	60%	8e-67	82.88%	<a href="#">KY296308.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Saccharina japonica GDP-mannose 6-dehydrogenase 2 mRNA complete cds</a>	266	325	60%	8e-67	82.88%	<a href="#">KP172531.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Apteryx australis mantelli genome assembly AptMant0_scaffold scaffold459</a>	44.6	44.6	9%	4.5	79.59%	<a href="#">LK065047.1</a>	

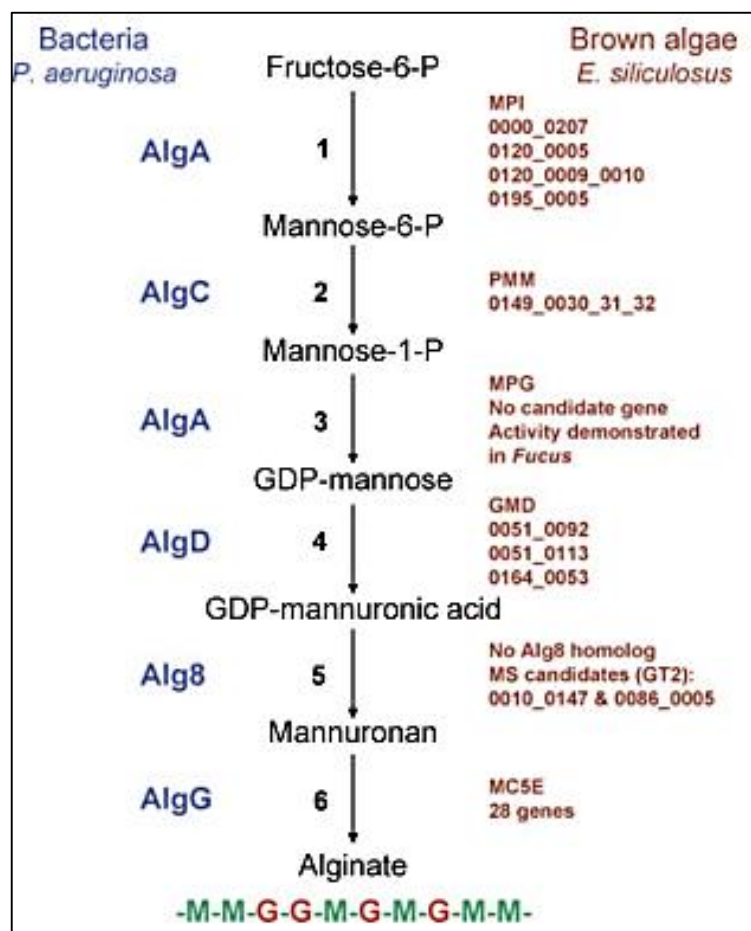
**ANEXO 17.** Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algG* en *Macrocystis pyrifera*

Descriptions						
Graphic Summary						
Alignments						
Taxonomy						
Sequences producing significant alignments						
Download						
Manage Columns						
Show 100						
select all 8 sequences selected						
GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharina japonica c5epi mRNA for mannuronan C-5 epimerase, complete cds	220	220	39%	1e-52	79.68%	AB299380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharina japonica c5epi gene for mannuronan C-5 epimerase, complete cds	187	187	26%	7e-43	84.52%	LC053765.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E4	177	177	38%	1e-39	76.42%	AJ496452.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E2	177	177	37%	1e-39	77.12%	AJ496450.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E1	174	174	39%	4e-39	76.31%	AJ496449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E6	170	170	39%	5e-38	75.30%	AJ496454.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E5	155	155	39%	4e-33	73.91%	AJ496453.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E3	152	152	39%	1e-32	73.71%	AJ496451.1

**ANEXO 18.** Secuencias que producen alineamientos significativos en el gen *algG* en *Macrocystis integrifolia*

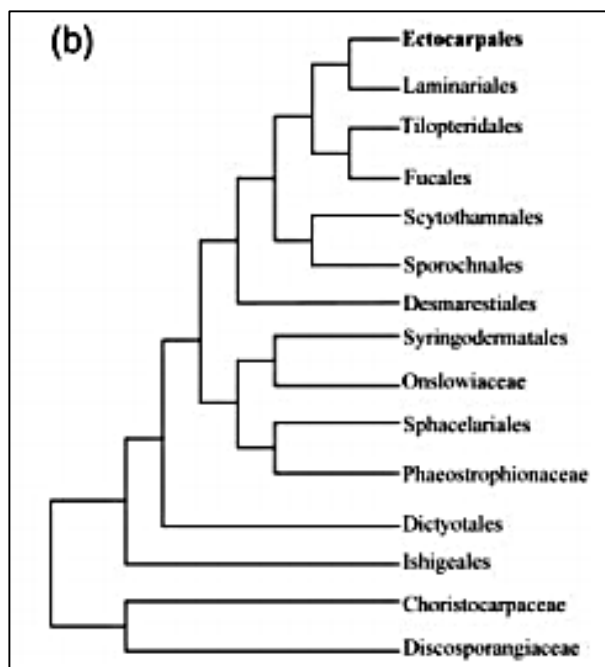
Descriptions						
Graphic Summary						
Alignments						
Taxonomy						
Sequences producing significant alignments						
Download						
Manage Columns						
Show 100						
select all 8 sequences selected						
GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharina japonica c5epi mRNA for mannuronan C-5 epimerase, complete cds	203	203	39%	9e-48	78.09%	AB299380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Saccharina japonica c5epi gene for mannuronan C-5 epimerase, complete cds	187	187	26%	7e-43	84.52%	LC053765.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E4	178	178	39%	4e-40	76.33%	AJ496452.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E1	171	171	39%	5e-38	75.81%	AJ496449.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E2	168	168	37%	6e-37	75.95%	AJ496450.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E6	162	162	39%	3e-35	74.50%	AJ496454.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E3	153	153	39%	1e-32	73.71%	AJ496451.1
<input checked="" type="checkbox"/> Laminaria digitata partial mRNA for mannuronan C-5 epimerase (epi gene), clone ManC5-E5	150	150	39%	2e-31	72.94%	AJ496453.1

**ANEXO 19.** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de alginato en bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) y algas pardas (*Ectocarpus siliculosus*). (Michael et al., 2010)



Las enzimas relacionadas con alginato de *P. aeruginosa* se indican en el lado izquierdo, según la literatura. Los productos genéticos que probablemente pertenecen a la ruta de biosíntesis de alginato en *E. siliculosus* se indican en el lado derecho con el código XXXX\_YYYY, indica la accesión para la búsqueda en el NCBI. GMD, GDP-manosa 6-deshidrogenasa; MC5E, manuronato C5-epimerasa; MPG, manosa-1-fosfato guanililtransferasa; MPImanosa-6-fosfato isomerasa; MS, manuronano sintasa;PMM, fosfomannomutasa.

**ANEXO 20.** Posición de los Ectocarpales (en negrita) dentro de las algas pardas (adaptado de Kawai et al., 2007).



**ANEXO 21.** Extracción de ADN genómico *Sargassum sp* (Fucales), muestras colectadas en Ecuador.

Nº	Código	Muestra	ADN ng/µl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	Sg_1_DNA	<i>Sargassum sp</i>	83.4	1.93	1.47
2	Sg_2_DNA	<i>Sargassum sp</i>	73.7	1.89	1.40
3	Sg_3_DNA	<i>Sargassum sp</i>	356.5	1.99	1.91
4	Sg_4_DNA	<i>Sargassum sp</i>	465.3	2.00	1.84
5	Sg_5_DNA	<i>Sargassum sp</i>	403.2	1.97	1.33
6	Sg_6_DNA	<i>Sargassum sp</i>	304.4	1.98	1.85
7	Sg_7_DNA	<i>Sargassum sp</i>	764.8	2.00	1.75
8	Sg_8_DNA	<i>Sargassum sp</i>	94.1	1.85	1.34
9	Sg_9_DNA	<i>Sargassum sp</i>	1051.2	2.07	0.32
10	Sg_10_DNA	<i>Sargassum sp</i>	1029.9	2.05	0.36
11	Sg_11_DNA	<i>Sargassum sp</i>	1048.7	2.06	0.26
12	Sg_12_DNA	<i>Sargassum sp</i>	528.2	1.90	1.86
13	Sg_13_DNA	<i>Sargassum sp</i>	459.9	1.88	1.81
14	Sg_14_DNA	<i>Sargassum sp</i>	474.1	1.88	1.77
15	Sg_15_DNA	<i>Sargassum sp</i>	1012.9	1.63	1.34
16	Sg_16_DNA	<i>Sargassum sp</i>	838.5	1.29	0.32

17	Sg_17_DNA	<i>Sargassum sp</i>	808.5	1.30	0.36
18	Sg_18_DNA	<i>Sargassum sp</i>	609.3	1.15	0.26
19	Sg_19_DNA	<i>Sargassum sp</i>	427.3	2.04	1.57
20	Sg_20_DNA	<i>Sargassum sp</i>	991.1	1.98	0.90
21	Sg_21_DNA	<i>Sargassum sp</i>	990.3	1.99	0.60
22	Sg_22_DNA	<i>Sargassum sp</i>	987.6	1.93	0.72
23	Sg_23_DNA	<i>Sargassum sp</i>	61.7	2.07	1.84
24	Sg_24_DNA	<i>Sargassum sp</i>	478.7	2.01	1.72
25	Sg_25_DNA	<i>Sargassum sp</i>	95.4	1.89	1.35
26	Sg_26_DNA	<i>Sargassum sp</i>	97.6	1.86	1.37
27	Sg_27_DNA	<i>Sargassum sp</i>	227.9	1.79	0.90
28	Sg_28_DNA	<i>Sargassum sp</i>	281.1	1.41	0.60
29	Sg_29_DNA	<i>Sargassum sp</i>	434.8	1.83	1.76
30	Sg_30_DNA	<i>Sargassum sp</i>	415.1	1.85	1.75
31	Sg_31_DNA	<i>Sargassum sp</i>	410.9	1.78	1.77
32	Sg_32_DNA	<i>Sargassum sp</i>	482.8	1.84	1.67
33	Sg_33_DNA	<i>Sargassum sp</i>	541.5	1.79	1.76
34	Sg_34_DNA	<i>Sargassum sp</i>	566.1	1.81	1.79
35	Sg_35_DNA	<i>Sargassum sp</i>	552.9	1.79	1.80
36	Sg_36_DNA	<i>Sargassum sp</i>	543.7	1.78	1.75
37	Sg_37_DNA	<i>Sargassum sp</i>	530.4	1.72	1.70
38	Sg_38_DNA	<i>Sargassum sp</i>	207.5	1.54	1.07
39	Sg_39_DNA	<i>Sargassum sp</i>	153.6	1.34	0.91
40	Sg_40_DNA	<i>Sargassum sp</i>	212.9	1.44	1.06
41	Sg_41_DNA	<i>Sargassum sp</i>	200.5	1.61	1.09
42	Sg_42_DNA	<i>Sargassum sp</i>	409.3	1.58	1.07

**ANEXO 22.** Extracción de ADN genómico *Macrocystis pyrifera* (Laminariales), muestras colectadas en Chile.

N°	Código	Muestra	ADN ng/μl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	Ch_1_DNA	<i>M. pyrifera</i>	829.0	1.63	1.34
2	Ch_2_DNA	<i>M. pyrifera</i>	841.0	1.73	1.42
3	Ch_3_DNA	<i>M. pyrifera</i>	717.3	1.82	1.48
4	Ch_4_DNA	<i>M. pyrifera</i>	805.4	1.90	1.59
5	Ch_5_DNA	<i>M. pyrifera</i>	829.2	1.82	1.48
6	Ch_6_DNA	<i>M. pyrifera</i>	874.5	1.80	1.50
7	Ch_7_DNA	<i>M. pyrifera</i>	829.2	1.82	1.48
8	Ch_8_DNA	<i>M. pyrifera</i>	874.5	1.80	1.40
9	Ch_9_DNA	<i>M. pyrifera</i>	157.7	1.52	0.61
10	Ch_10_DNA	<i>M. pyrifera</i>	163.1	1.37	0.58
11	Ch_11_DNA	<i>M. pyrifera</i>	416.2	1.95	1.31



12	Ch_12_DNA	<i>M. pyrifera</i>	149.3	2.02	1.10
13	Ch_13_DNA	<i>M. pyrifera</i>	7.4	1.20	0.55
14	Ch_14_DNA	<i>M. pyrifera</i>	20.5	1.86	1.15
15	Ch_15_DNA	<i>M. pyrifera</i>	22.5	1.85	1.08
16	Ch_16_DNA	<i>M. pyrifera</i>	15.6	1.66	1.11
17	Ch_17_DNA	<i>M. pyrifera</i>	13.1	1.83	1.32
18	Ch_18_DNA	<i>M. pyrifera</i>	515.1	2.03	1.30
19	Ch_19_DNA	<i>M. pyrifera</i>	550.7	1.91	1.06
20	Ch_20_DNA	<i>M. pyrifera</i>	154.0	2.01	1.14
21	Ch_21_DNA	<i>M. pyrifera</i>	466.0	2.18	1.56
22	Ch_22_DNA	<i>M. pyrifera</i>	743.7	1.52	0.52
23	Ch_23_DNA	<i>M. pyrifera</i>	399.6	1.89	0.95
24	Ch_24_DNA	<i>M. pyrifera</i>	409.0	1.91	0.97
25	Ch_25_DNA	<i>M. pyrifera</i>	671.0	1.97	1.75
26	Ch_26_DNA	<i>M. pyrifera</i>	423.7	1.86	1.34
27	Ch_27_DNA	<i>M. pyrifera</i>	437.6	1.89	1.67
28	Ch_28_DNA	<i>M. pyrifera</i>	577.4	1.84	1.69
29	Ch_29_DNA	<i>M. pyrifera</i>	670.1	1.72	1.80
30	Ch_30_DNA	<i>M. pyrifera</i>	233.1	1.72	1.35
31	Ch_31_DNA	<i>M. pyrifera</i>	837.7	2.15	2.12
32	Ch_32_DNA	<i>M. pyrifera</i>	950.3	2.18	2.21
33	Ch_33_DNA	<i>M. pyrifera</i>	685.7	2.09	2.02
34	Ch_34_DNA	<i>M. pyrifera</i>	1141.0	2.14	2.06
35	Ch_35_DNA	<i>M. pyrifera</i>	653.3	2.12	2.04
36	Ch_36_DNA	<i>M. pyrifera</i>	334.0	1.76	0.90
37	Ch_37_DNA	<i>M. pyrifera</i>	670.1	1.82	1.80
38	Ch_38_DNA	<i>M. pyrifera</i>	233.1	1.86	1.35
39	Ch_39_DNA	<i>M. pyrifera</i>	837.7	1.80	1.19
40	Ch_40_DNA	<i>M. pyrifera</i>	550.7	1.81	1.06
41	Ch_41_DNA	<i>M. pyrifera</i>	154.0	1.85	1.14
42	Ch_42_DNA	<i>M. pyrifera</i>	466.0	1.78	1.56
43	Ch_43_DNA	<i>M. pyrifera</i>	243.0	1.82	1.52
44	Ch_44_DNA	<i>M. pyrifera</i>	281.6	1.89	1.85
45	Ch_45_DNA	<i>M. pyrifera</i>	419.0	1.71	1.77
46	Ch_46_DNA	<i>M. pyrifera</i>	481.0	1.87	1.75
47	Ch_47_DNA	<i>M. pyrifera</i>	393.7	1.80	1.34
48	Ch_48_DNA	<i>M. pyrifera</i>	439.9	1.82	1.67
49	Ch_49_DNA	<i>M. pyrifera</i>	377.3	1.86	1.69

**ANEXO N° 23.** Extracción ADN genómico *Macrocystis pyrifera* y *M. integrifolia*  
(Laminariales), muestras colectadas en Perú.

N°	Código	Muestra	ADN ng/μl	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	Mi_1_DNA	<i>M. integrifolia</i>	43.0	1.55	0.54
2	Mi_2_DNA	<i>M. integrifolia</i>	38.0	1.50	0.53
3	Mi_3_DNA	<i>M. integrifolia</i>	13.2	1.97	1.42
4	Mi_4_DNA	<i>M. integrifolia</i>	24.2	1.69	0.95
5	Mi_5_DNA	<i>M. integrifolia</i>	38.0	1.83	1.06
6	Mi_6_DNA	<i>M. integrifolia</i>	13.2	1.96	1.84
7	Mi_7_DNA	<i>M. integrifolia</i>	24.2	2.07	1.83
8	Mi_8_DNA	<i>M. integrifolia</i>	1089.9	1.37	0.45
9	Mi_9_DNA	<i>M. integrifolia</i>	1070.4	1.46	0.46
10	Mi_10_DNA	<i>M. integrifolia</i>	1074.1	1.57	0.64
11	Mi_11_DNA	<i>M. integrifolia</i>	633.9	1.37	0.42
12	Mi_12_DNA	<i>M. integrifolia</i>	961.1	1.38	0.49
13	Mi_13_DNA	<i>M. integrifolia</i>	960.7	1.36	0.62
14	Mi_14_DNA	<i>M. integrifolia</i>	963.9	1.68	0.61
15	Mi_15_DNA	<i>M. integrifolia</i>	8.7	1.35	0.34
16	Mi_16_DNA	<i>M. integrifolia</i>	24.0	1.26	0.89
17	Mi_17_DNA	<i>M. integrifolia</i>	36.9	1.76	0.77
18	Mi_18_DNA	<i>M. integrifolia</i>	7.9	1.66	0.71
19	Mi_19_DNA	<i>M. integrifolia</i>	829.0	1.63	1.34
20	Mi_20_DNA	<i>M. integrifolia</i>	25.6	1.62	0.21
21	Mi_21_DNA	<i>M. integrifolia</i>	951.2	1.23	0.30
22	Mi_22_DNA	<i>M. integrifolia</i>	112.6	1.51	0.31
23	Mi_23_DNA	<i>M. integrifolia</i>	240.8	1.40	0.34
24	Mi_24_DNA	<i>M. integrifolia</i>	13.9	1.11	0.46
25	Mi_25_DNA	<i>M. integrifolia</i>	813.8	1.96	1.15
26	Mi_26_DNA	<i>M. integrifolia</i>	823.9	2.10	1.61
27	Mi_27_DNA	<i>M. integrifolia</i>	1200.3	2.03	1.52
28	Mi_28_DNA	<i>M. integrifolia</i>	420.7	1.87	0.99
29	Mi_29_DNA	<i>M. integrifolia</i>	629.3	1.72	0.85
30	Mi_30_DNA	<i>M. integrifolia</i>	733.7	1.86	0.99
31	Mi_31_DNA	<i>M. integrifolia</i>	421.7	1.83	0.87
32	Mi_32_DNA	<i>M. integrifolia</i>	199.3	2.07	1.47
33	Mi_33_DNA	<i>M. integrifolia</i>	464.2	1.92	1.03
34	Mi_34_DNA	<i>M. integrifolia</i>	352.8	2.03	1.34

35	Mi_35_DNA	<i>M. integrifolia</i>	278.9	1.86	1.92
36	Mi_36_DNA	<i>M. integrifolia</i>	296.0	1.81	1.78
37	Mi_37_DNA	<i>M. integrifolia</i>	325.0	1.82	1.84
38	Mi_38_DNA	<i>M. integrifolia</i>	574.6	1.85	1.79
39	Mi_39_DNA	<i>M. integrifolia</i>	912.9	1.86	1.60
40	Mi_40_DNA	<i>M. integrifolia</i>	396.5	2.03	1.70
41	Mi_41_DNA	<i>M. integrifolia</i>	204.4	1.73	0.63
42	Mi_42_DNA	<i>M. integrifolia</i>	216.5	1.79	1.70
43	Mi_43_DNA	<i>M. integrifolia</i>	360.5	1.86	0.72
44	Mi_44_DNA	<i>M. integrifolia</i>	555.5	1.96	1.27
45	Mp_1_DNA	<i>M. pyrifera</i>	851.4	1.87	0.42
46	Mp_2_DNA	<i>M. pyrifera</i>	946.6	1.88	0.39
47	Mp_3_DNA	<i>M. pyrifera</i>	994.7	1.91	0.44
48	Mp_4_DNA	<i>M. pyrifera</i>	321.9	1.29	0.42
49	Mp_5_DNA	<i>M. pyrifera</i>	310.6	1.40	0.44
50	Mp_6_DNA	<i>M. pyrifera</i>	57.1	1.72	0.53
51	Mp_7_DNA	<i>M. pyrifera</i>	333.5	1.39	0.50
52	Mp_8_DNA	<i>M. pyrifera</i>	82.3	1.62	0.54
53	Mp_9_DNA	<i>M. pyrifera</i>	18.6	1.71	0.75
54	Mp_10_DNA	<i>M. pyrifera</i>	19.5	1.80	0.74
55	Mp_11_DNA	<i>M. pyrifera</i>	7.1	1.88	1.25
56	Mp_12_DNA	<i>M. pyrifera</i>	6.7	1.86	1.43
57	Mp_13_DNA	<i>M. pyrifera</i>	3.7	1.70	1.19
58	Mp_14_DNA	<i>M. pyrifera</i>	190.1	1.40	0.58
59	Mp_15_DNA	<i>M. pyrifera</i>	30.1	1.73	0.63
60	Mp_16_DNA	<i>M. pyrifera</i>	33.2	1.63	0.69
61	Mp_17_DNA	<i>M. pyrifera</i>	190.4	1.43	0.42
62	Mp_18_DNA	<i>M. pyrifera</i>	462.3	1.27	0.50
63	Mp_19_DNA	<i>M. pyrifera</i>	34.7	1.37	0.24
64	Mp_20_DNA	<i>M. pyrifera</i>	14.4	1.55	0.38
65	Mp_21_DNA	<i>M. pyrifera</i>	158.0	1.31	0.56
66	Mp_22_DNA	<i>M. pyrifera</i>	73.3	1.33	0.73
67	Mp_23_DNA	<i>M. pyrifera</i>	86.2	1.31	0.34
68	Mp_24_DNA	<i>M. pyrifera</i>	542.2	1.76	0.84
69	Mp_25_DNA	<i>M. pyrifera</i>	639.5	1.73	0.80
70	Mp_26_DNA	<i>M. pyrifera</i>	374.5	1.93	1.17
71	Mp_27_DNA	<i>M. pyrifera</i>	92.0	2.04	0.16
72	Mp_28_DNA	<i>M. pyrifera</i>	199.7	1.47	0.28
73	Mp_29_DNA	<i>M. pyrifera</i>	135.4	1.70	0.26

